



**Ana Filipa Lá-Salette  
Costa**

**Quantificação de mercúrio em água de consumo:  
validação do método na Luságua**





**Ana Filipa Lá-Salette  
Costa**

**Quantificação de mercúrio em águas de consumo:  
validação do método na Luságua**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, ramo de Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Batista Lopes, Pós-Doc no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, da Doutora Maria Eduarda Pereira, Professora Associada do Departamento Química da Universidade de Aveiro e da Dra. Margarida Côrte-Real, Diretora do Laboratório Luságua.



Dedico este trabalho à minha irmã



## **o júri**

presidente

### **Doutor Artur Manuel Soares da Silva**

professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

### **Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva**

investigador no Centro de Ciências Moleculares e Materiais da Universidade de Lisboa

### **Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira**

professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

Agradeço à Professora Doutora Eduarda Pereira pela oportunidade de realizar a minha tese em âmbito empresarial e pela orientação científica ao longo do trabalho.

À Doutora Cláudia Lopes agradeço toda a disponibilidade, incentivo, orientação científica e apoio ao longo da realização deste trabalho.

À Dra. Margarida Côrte Real, que como diretora do laboratório Luságua, me proporcionou a oportunidade de integrar na sua equipa, permitindo que eu adquirisse experiência profissional.

Ao Sr. Murça pela ajuda preciosa no equipamento de absorção atómica, por toda a disponibilidade, paciência, apoio, e por todos os ensinamentos que permearam agradáveis conversas.

Uma vez que para a realização da tese estes últimos anos de formação foram essenciais, agradeço a todos os docentes da Universidade de Aveiro com os quais tive a oportunidade de ter aulas e que para além da competência e profissionalismo, se mostraram sempre disponíveis para me auxiliar ao longo do meu percurso de aprendizagem.

Aos preciosos amigos que fiz durante o meu percurso académico, e que certamente ficaram para a vida: Rute, Victorina, Tiago, Leonor, Rui, Joana, Inês, César, Tatiana, entre muitos outros.

Aos meus pais, aos meus avós, e à minha irmã pelo enorme apoio e afeto. A minha formação só foi possível graças aos sacrifícios que tiveram que fazer.

Ao Carlos por tudo.

Obrigada a todos!



## **palavras-chave**

Controlo de qualidade, água de consumo humano, absorção atómica, fluorescência atómica, mercúrio.

## **resumo**

Para o ser humano, a água sempre foi um recurso essencial ao longo da sua evolução. Hoje em dia, com todo o avanço tecnológico, a água é um bem muito vulnerável às diversas atividades antropogénicas. Entre os muitos contaminantes que podem afetar a qualidade da água para consumo humano, os metais causam grande preocupação devido à sua elevada toxicidade. O mercúrio é um dos contaminantes que deve ser devidamente controlado devido ao seu elevado grau de toxicidade.

Este Estágio foi realizado no Laboratório Luságua e o seu principal objetivo foi avaliar se era possível baixar o limite de quantificação da técnica existente na empresa para quantificar o mercúrio em águas de consumo e validar o método através do cálculo de vários parâmetros de controlo de qualidade.

Foi ainda feita a comparação entre a técnica de quantificação de mercúrio existente na Luságua (CV-AAS) e a existente na Universidade de Aveiro (CV-AFS) para avaliar se havia uma mais-valia para a Luságua se adquirisse um novo equipamento para analisar o mercúrio em águas.

Os parâmetros de validação avaliados nos dois métodos deram resultados semelhantes, não identificando a necessidade atual de substituir o equipamento existente na Luságua, até porque se conseguiu baixar o limite de quantificação, atingindo assim o objetivo estabelecido no início para este Estágio.



**keywords**

Quality control, drinking water, atomic absorption, atomic fluorescence, mercury

**abstract**

For humans, water has always been an essential resource throughout its evolution. Nowadays, with the technological advances, the water is vulnerable to various anthropogenic activities. Among the many contaminants that can affect water quality, the metals are some that concern us due to their high toxicity. Mercury is one of the contaminants that must be adequately controlled due to its high degree of toxicity.

This internship was performed at the Luságua Laboratory and its main objective was to evaluate if it was possible to lower the quantification limit of mercury in water samples of the existing technique in the company and to validate the method by calculating various parameters of quality control.

It was also made a comparison between the technique of quantification of mercury already existing in Luságua (CV-AAS) and the technique existing in the University of Aveiro (CV-AFS) to assess the advantage of Luságua purchasing a new equipment to analyse the mercury in water.

The validation parameters evaluated in the two methods give similar results which means that there is no need to replace the existing equipment in Luságua once we were able to lower the quantification limit, which was the objective of this internship.



# Índice

1. Contextualização e objetivos do Estágio.....	1
1.1. Luságua - apresentação da empresa onde o Estágio foi realizado .....	1
1.2. Objetivos do Estágio .....	2
1.3. A água e a sua importância .....	3
1.4. Contaminação da água: causas e efeitos .....	5
1.5. Parâmetros de avaliação da qualidade da água – evolução histórica .....	8
1.5.1. Legislação sobre qualidade da água .....	11
1.6. O mercúrio como contaminante da água.....	16
Fontes naturais e antropogénicas .....	16
Toxicidade do mercúrio e exposição humana .....	17
1.6.1. Lavagem dos frascos, preservação e pré-tratamento das amostras de água para a quantificação de mercúrio .....	19
1.7. Quantificação de mercúrio em águas de consumo humano - principais técnicas ...	21
1.7.1. Espectroscopia de fluorescência atômica de vapor frio .....	21
1.7.2. Espectroscopia de absorção atômica de vapor frio .....	23
2. Materiais e métodos .....	25
2.1. Materiais, reagentes e equipamentos.....	25
2.2. Lavagem do material .....	26
2.3. Preparação das soluções-padrão.....	27
2.4. Amostras: descrição e preparação .....	28
2.5. Controlo de qualidade dos resultados.....	30
2.6. Condições de operação dos equipamentos .....	31
3. Apresentação e discussão de resultados .....	33
3.1. Procedimento de validação dos métodos de quantificação de mercúrio usados no Estágio .....	33





3.2. Validação do método de quantificação de mercúrio por absorção atômica no Laboratório Luságua.....	34
3.2.1. Avaliação indireta .....	34
Gama de concentrações de trabalho .....	34
Curva de calibração .....	36
Limite de quantificação .....	44
Ensaio de recuperação .....	45
Precisão (repetibilidade e precisão intermédia) .....	47
3.2.2. Avaliação direta .....	58
Cartas de controlo.....	58
3.3. Validação do método de quantificação de mercúrio por fluorescência atômica no Laboratório da UA.....	64
3.3.1. Avaliação indireta .....	64
Gama de trabalho .....	64
Reta de calibração .....	65
Limite de quantificação .....	69
Ensaio de recuperação .....	70
Precisão (repetibilidade e precisão intermédia) .....	71
3.3.2. Avaliação direta .....	78
Cartas de controlo.....	78
3.4. Comparação do método de quantificação de mercúrio usado na Luságua e na UA	81
REFERÊNCIAS .....	89
Referências consultadas em web sites.....	93



# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – a) Evolução do indicador água segura em Portugal Continental b) Percentagem de água segura em Portugal continental [III].....	11
<b>Figura 2</b> – Esquema da técnica de fluorescência atômica de vapor frio para a quantificação de mercúrio e respetivo equipamento utilizado na Universidade de Aveiro. ....	22
<b>Figura 3</b> – Esquema da técnica de absorção atômica de vapor frio para a quantificação de mercúrio e respetivo equipamento utilizado na Luságua.....	23
<b>Figura 4</b> – Esteiro de Estarreja. ....	28
<b>Figura 5</b> – Estrada da Bestida sul. ....	29
<b>Figura 6</b> – Estrada da Bestida norte.....	29
<b>Figura 7</b> – Curva de calibração para a análise de Hg em CV-AAS (Abril 2014). ....	41
<b>Figura 8</b> – Valor dos resíduos para cada um dos padrões da curva de calibração (Abril 2014).....	41
<b>Figura 9</b> – Curvas associadas ao intervalo de confiança para os padrões de Hg em CV-AAS (Abril 2014). ....	42
<b>Figura 10</b> – Carta de aceitação de declives para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	60
<b>Figura 11</b> – Carta de aceitação para brancos ( $\mu\text{g/L}$ ) para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura). ...	60
<b>Figura 12</b> – Carta de indivíduos para o padrão de controlo $1 \mu\text{g/L}$ para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	61
<b>Figura 13</b> – Carta de indivíduos para o padrão de controlo $0,3 \mu\text{g/L}$ para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	61
<b>Figura 14</b> – Carta de controlo de amplitudes de duplicados para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura). ....	62
<b>Figura 15</b> – Curva de calibração para a análise de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013). ....	67



<b>Figura 16</b> – Valor dos resíduos para cada um dos padrões da reta de calibração para a quantificação de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013) .....	68
<b>Figura 17</b> – Curvas associadas ao intervalo de confiança para os padrões de Hg em CV-AFS (Dezembro de 2013).....	68
<b>Figura 18</b> – Carta de controlo para a aceitação de declives para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	79
<b>Figura 19</b> – Carta de aceitação para brancos ( $\mu\text{g/L}$ ) para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	79
<b>Figura 20</b> – Carta de indivíduos para o padrão de controlo de $0,1 \mu\text{g/L}$ para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	80
<b>Figura 21</b> – Carta de controlo para o padrão de controlo de $0,4 \mu\text{g/L}$ para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	80
<b>Figura 22</b> – Carta de controlo de amplitudes de duplicados para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).....	81
<b>Figura 23</b> – Concentração de Hg ( $\mu\text{g/L}$ ) em amostras analisadas por CV-AAS e CV-AFS. ....	85



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Lista de contaminantes controlados e respetivo grau de perigosidade de acordo com a ATSDR ( <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> ) [II]. .....	7
<b>Tabela 2</b> – Valores paramétricos relativos a alguns parâmetros químicos, microbiológicos e indicadores na água destinada ao consumo humano (Anexo I do Decreto-Lei nº306/2007) [IV]. .....	12
<b>Tabela 3</b> – Frequência mínima de amostragem e de análise da água destinada a consumo humano fornecida por uma rede de distribuição. ....	13
<b>Tabela 4</b> – Frequência mínima de amostragem e de análise da água destinada a consumo humano fornecida por uma entidade gestora em alta*. ....	14
<b>Tabela 5</b> – Frequência de amostragem e análise de águas colocadas à venda em garrafas. ....	14
<b>Tabela 6</b> – Características de desempenho dos métodos analíticos utilizados na análise de água destinada ao consumo humano [IV]. ....	15
<b>Tabela 7</b> – Lista de material, reagentes e equipamentos usados na Luságua e na Universidade de Aveiro. ....	25
<b>Tabela 8</b> – Concentração dos padrões de calibração a considerar na absorção atómica. ....	27
<b>Tabela 9</b> – Concentração dos padrões de calibração a considerar na fluorescência atómica. ....	27
<b>Tabela 10</b> – Condições de operação do equipamento de fluorescência atómica. ....	31
<b>Tabela 11</b> – Condições de operação do equipamento de absorção atómica. ....	32
<b>Tabela 12</b> – Medições do padrão de 0,3 µg/L e 2 µg/L para o teste da homogeneidade de variâncias (Dia 1- Março de 2014). ....	35
<b>Tabela 13</b> – Resultados do teste de homogeneidade de variâncias para o dia 2 – Abril de 2014 e para o dia 3 – Maio de 2014 .....	35
<b>Tabela 14</b> – Média das intensidades obtidas para os padrões de calibração de Hg em CV-AAS (Abril de 2014). ....	36
<b>Tabela 15</b> – Teste $t$ (teste de hipóteses) para a decisão de pontos pertencentes à curva de calibração (Abril de 2014). ....	37
<b>Tabela 16</b> – Teste $F$ para verificar a linearidade da curva de calibração. ....	38
<b>Tabela 17</b> – Coeficientes de correlação para os modelos linear, quadrático e cúbico... ..	38





<b>Tabela 18</b> – Valores de concentração correspondentes a determinados valores de absorvância obtidos pelos modelos linear, quadrático e cúbico. ....	39
<b>Tabela 19</b> – Sensibilidade associada a cada valor de concentração da curva de calibração e respetivo intervalo de confiança (Abril de 2014). ....	40
<b>Tabela 20</b> – Parâmetros da curva de calibração a análise de Hg em CV-AAS (Abril 2014). ....	40
<b>Tabela 21</b> – Parâmetros das curvas de calibração usadas para a determinação de Hg por CV-AAS. ....	43
<b>Tabela 22</b> – Leituras do padrão de 0,3 µg/L para validação do limite de quantificação. ....	44
<b>Tabela 23</b> – Ensaios de recuperação na análise de Hg por CV-AAS. ....	46
<b>Tabela 24</b> – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 2) em Abril de 2014, em dias consecutivos. ....	48
<b>Tabela 25</b> – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1) em Maio de 2014, em dias consecutivos. ....	49
<b>Tabela 26</b> – Repetibilidade do padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 2). ....	50
<b>Tabela 27</b> – Repetibilidade do padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1). ....	50
<b>Tabela 28</b> – Teste <i>F</i> para testar diferenças entre as análises do padrão de 0,3 µg/L feitas por dois analistas. ....	51
<b>Tabela 29</b> – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1) em Maio de 2014, em dias consecutivos. ....	51
<b>Tabela 30</b> – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1) em Maio de 2014, em dias consecutivos. ....	52
<b>Tabela 31</b> – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 2) em Junho de 2014, em dias consecutivos. ....	52
<b>Tabela 32</b> – Repetibilidade do padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS para os dois analistas. ....	52
<b>Tabela 33</b> – Teste <i>F</i> para testar diferenças entre as análises ao padrão de 2 µg/L feitas por dois analistas. ....	53
<b>Tabela 34</b> – Repetibilidade do padrão intermédio de concentração 0,8 µg/L de Hg para os dois analistas. ....	53



<b>Tabela 35</b> – Teste <i>F</i> para testar diferenças entre as análises do padrão intermédio de 0,8 µg/L feitas por dois analistas. ....	54
<b>Tabela 36</b> – Repetibilidade do padrão de concentração 1 µg/L de Hg em CV-AAS para os dois analistas. ....	54
<b>Tabela 37</b> – Teste <i>F</i> para testar diferenças entre as análises ao padrão de 1 µg/L feitas por dois analistas. ....	54
<b>Tabela 38</b> – Precisão intermédia variando a concentração da amostra ou do padrão no método de CV-AAS. ....	55
<b>Tabela 39</b> – Precisão intermédia para o padrão intermédio de 0,8 µg/L variando o dia da análise. ....	56
<b>Tabela 40</b> – Precisão intermédia para o padrão de 0,3 µg/L variando o dia da análise. ....	57
<b>Tabela 41</b> – Precisão intermédia para a RELACRE 2013 variando o dia da análise. ....	57
<b>Tabela 42</b> – Precisão intermédia para o padrão de 2 µg/L variando o dia da análise....	58
<b>Tabela 43</b> – Ficha de validação para o método de quantificação de Hg por CV-AAS a ser executado na Luságua.....	63
<b>Tabela 44</b> – Medições do padrão de 0,1 µg/L e 0,5 µg/L para o teste da homogeneidade de variâncias (Dia 1 – Abril de 2014). ....	64
<b>Tabela 45</b> – Média das intensidades obtidas para os padrões de calibração de Hg em CV-AFS (Dezembro de 2013).....	65
<b>Tabela 46</b> – Teste <i>t</i> (teste de hipóteses) para a decisão de pontos pertencentes à reta de calibração (Dezembro de 2013).....	65
<b>Tabela 47</b> – Teste <i>F</i> para verificar a linearidade da reta de calibração. ....	66
<b>Tabela 48</b> – Coeficientes de correlação para os modelos linear e quadrático. ....	66
<b>Tabela 49</b> – Parâmetros da reta de calibração para quantificação de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013). ....	67
<b>Tabela 50</b> – Parâmetros das curvas de calibração usadas para a determinação de Hg por CV-AFS. ....	69
<b>Tabela 51</b> – Leituras do padrão de 0,1 µg/L para validação do limite de quantificação para a quantificação de Hg por CV-AFS.....	70
<b>Tabela 52</b> – Ensaios de recuperação na análise de Hg por CV-AFS.....	71
<b>Tabela 53</b> – Teste de Grubbs para o padrão intermédio de concentração 0,25 µg/L para a quantificação de Hg por CV-AFS, em Dezembro de 2013, em dias consecutivos. ....	72



<b>Tabela 54</b> – Repetibilidade do padrão intermédio de concentração 0,25 µg/L para a quantificação de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013). .....	72
<b>Tabela 55</b> – Repetibilidade para os padrões 0,1; 0,4 e 0,5 µg/L para a quantificação de Hg por CV-AFS.....	73
<b>Tabela 56</b> – Precisão intermédia variando a concentração da amostra ou do padrão para a quantificação de Hg por CV-AFS.....	74
<b>Tabela 57</b> – Precisão intermédia para o padrão intermédio de 0,25 µg/L variando o dia da análise. ....	75
<b>Tabela 58</b> – Precisão intermédia para a amostra colhida no poço 1 variando o dia da análise (Maio de 2014). ....	75
<b>Tabela 59</b> – Precisão intermédia para a amostra colhida no poço 2 variando o dia da análise (Maio de 2014). ....	76
<b>Tabela 60</b> – Precisão intermédia para a amostra colhida no Esteiro de Estarreja variando o dia da análise (Maio de 2014).....	76
<b>Tabela 61</b> – Precisão intermédia para a amostra Bestida sul 1 variando o dia da análise (Maio de 2014). ....	76
<b>Tabela 62</b> – Precisão intermédia para a RELACRE 2013 variando o dia da análise (Maio de 2014). ....	77
<b>Tabela 63</b> – Precisão intermédia para o padrão de 0,1 µg/L variando o dia da análise. 77	
<b>Tabela 64</b> – Precisão intermédia para o padrão de 0,5 µg/L variando o dia da análise. 78	
<b>Tabela 65</b> – Resultados obtidos no processo de validação para os métodos de utilizados na análise de Hg na Luságua e na UA .....	82
<b>Tabela 66</b> – Concentrações de Hg obtidos por ambos os métodos nas amostras de água analisadas.....	84



# 1. Contextualização e objetivos do Estágio

## 1.1. Luságua - apresentação da empresa onde o Estágio foi realizado

Constituída a 9 de Junho de 2006, a Luságua - Serviços Ambientais, S.A. resulta do processo de reestruturação das participações detidas pela empresa Aquapor. A Luságua agrega os serviços ambientais do Grupo Aquapor, tais como a operação e manutenção de estações de tratamento de águas residuais (ETAR's) e de outras infraestruturas hidráulicas, assistência técnica, auditoria especializada, e controlo estatístico que eram efetuadas pela Luságua – Gestão de Águas S.A. A Luságua é uma empresa de referência no âmbito da prestação de serviços ambientais, estando dirigida para a conservação, manutenção, gestão e exploração de sistemas de captação, tratamento e distribuição de águas, de sistemas de recolha, tratamento e rejeição de efluentes e de sistemas de recolha e tratamento de resíduos sólidos. A atividade da Luságua estende-se por 101 ETAR's, 243 estações elevatórias de águas residuais (EEAR's), serve 65 municípios e faz a recolha de  $46905 \times 10^3 \text{ m}^3$  de efluente.

A Luságua detém a certificação de acordo com as normas NP EN ISO 9001 “*Sistemas de Gestão da Qualidade: Requisitos*”, NP EN ISO 14001 “*Sistemas de gestão ambiental - Especificações e linhas de orientação para a sua utilização*”, e OHSAS 18001 “*Occupational health and safety management systems – Specification*”.

O Laboratório Luságua nasce da necessidade do Grupo Aquapor ter um laboratório de referência para controlo da qualidade da água destinada ao consumo humano e da água residual tratada nos sistemas que explora. Atualmente, 50% dos clientes do Laboratório Luságua são clientes externos, nomeadamente municípios e indústrias.

As instalações do Laboratório Luságua localizam-se em Albergaria-a-Velha, e dividem-se em quatro áreas: receção de amostras, análises físico-químicas de águas para consumo humano, análises físico-químicas de águas residuais e lamas e microbiologia.

Na área de receção de amostras são armazenados vários tipos de frascos apropriados para a colheita das amostras e é também nesta secção que se realiza todo o procedimento de lavagem, preparação dos frascos e preservação das amostras. A área de receção dispõe ainda de uma câmara frigorífica onde as amostras permanecem refrigeradas até serem analisadas ou levadas para laboratórios subcontratados.

A área de análises físico-químicas de água destinada ao consumo humano encontra-se dividida em dois setores: absorção atómica e físico-química clássica. Nestes setores efetuam-se diversas análises entre as quais, alcalinidade, dureza, oxidabilidade, nitratos, nitritos, azoto amoniacal e metais. Na secção de análises de águas residuais determinam-se, entre outros parâmetros, o teor de nitritos, cloretos, sólidos suspensos totais e voláteis, carência química e bioquímica de oxigénio e fósforo total. Na área de análises microbiológicas determinam-se enterococos fecais, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, entre outros parâmetros.

O Laboratório Luságua conta com um corpo técnico adequado, com habilitações e formação técnica contínua e adequada às funções que desempenham. O laboratório é acreditado pelo IPAC (Instituto Português da Acreditação) de acordo com a norma portuguesa NP EN ISO/IEC 17025, que define os “*Requisitos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração*” e consta também da lista de laboratórios aptos do IRAR (Instituto Regulador de Águas e Resíduos). Atualmente, este laboratório tem 46 parâmetros acreditados, para as matrizes águas para consumo humano, naturais, piscinas e residuais, bem como para a respetiva colheita de amostras para ensaios físico – químicos e microbiológicos.

## **1.2. Objetivos do Estágio**

Sendo a Luságua um laboratório acreditado para o controlo da qualidade da água destinada ao consumo humano, executa de acordo com o Decreto-Lei nº 306/2007 a determinação de mercúrio em águas para consumo por espectroscopia de absorção atómica com vapor frio. A Luságua identificou a necessidade de diminuir o limite de quantificação do seu método de análise de mercúrio na água de consumo, sendo este o principal objetivo deste Estágio, ou seja, o trabalho a realizar deve permitir demonstrar



que, com as condições existentes no Laboratório, é possível diminuir o anterior limite de quantificação de 0,4 µg/L, para o limite de quantificação admitido por lei que é 0,3 µg/L. Para tal, estabeleceram-se objetivos secundários, tais como alteração da gama de calibração de trabalho para valores mais baixos e validação do método através de avaliação indireta e direta.

Paralelamente, realizou-se um estudo na Universidade de Aveiro, utilizando a técnica de fluorescência atômica com vapor frio com o objetivo de comparar o desempenho de duas técnicas diferentes utilizadas frequentemente na quantificação de mercúrio em águas de consumo, pretendendo-se comparar os parâmetros de validação de ambas e a eventual mais-valia de o Laboratório Luságua adquirir um novo equipamento para quantificar o mercúrio nas suas amostras.

### **1.3. A água e a sua importância**

A água constitui um recurso essencial à vida. Para o Homem, a água sempre foi um recurso importantíssimo ao longo da sua evolução. As mais antigas civilizações do mundo, como por exemplo as do Egipto, da Suméria ou de Harapa, desenvolveram-se em terras áridas, que eram fertilizadas por grandes rios, cujas cheias periódicas traziam aos solos, sedentos e empobrecidos pela exploração agrícola cada vez mais intensa, a água que repunha a matéria orgânica e os nutrientes que as colheitas lhes retiravam. O estuário do Nilo foi assim, o berço de uma civilização que cresceu tendo por base as colheitas de cereais que as cheias garantiam. O mesmo processo permitiu que a civilização mesopotâmica se desenvolvesse nas terras aluviais, entre o rio Tigres e o rio Eufrates, e assim, foram fundadas civilizações com base na abundância de recursos hídricos (Gleick, 1993; Mendes e Oliveira, 2004).

Em muitas regiões nas quais o Homem pôde utilizar águas superficiais naturalmente abundantes, ou águas subterrâneas que aprendeu a captar, foi possível produzir mais alimentos do que os necessários, intensificando-se o comércio e as trocas de bens. O uso da água pelas civilizações teve como objetivo a intensificação da agricultura, de modo a, recorrendo à mão-de-obra disponível, melhorar a fertilidade do solo e otimizar as produções agrícolas e pecuárias associadas. Ao dispor de mais bens alimentares, tornava-se possível satisfazer as necessidades de mais habitantes, concentrados em cidades progressivamente maiores e, assim, aumentar o poder e a riqueza dos povos (Mendes e Oliveira, 2004).

Com o desenvolvimento da sociedade, foram construídas obras hidráulicas cada vez maiores e mais complexas, para gerir os recursos disponíveis ou armazenados, ou para assegurar proteções contra eventuais excessos de água. No mesmo sentido reuniram-se esforços para aproveitar com maior eficiência terrenos alagados ou pantanosos, construindo-se canais de drenagem ou jardins artificiais. Estas construções multiplicam-se nas margens do Mediterrâneo, por exemplo, para atenuar “excessos” associados a alterações climáticas e melhorar as paisagens, por vezes aridificadas. Para além disso, ao longo do tempo o Homem desenvolveu diversos engenhos para o aproveitamento de água como a nora para retirar água de rios e poços, moinhos de água para moer cereais e fez grandes invenções como o motor a vapor e a mais tarde a produção de eletricidade (Mendes e Oliveira, 2004).

O Homem consegue resistir meses à carência de alimentos que lhe forneçam suprimentos energéticos. Em condições de privação alimentar, a resistência à não ingestão de vitaminas e de minerais, pode prolongar-se por alguns meses. No entanto, em relação à água, a resistência à sua privação absoluta é de poucos dias, reduzindo-se em condições de perdas acrescentadas por exsudação. Esta dependência reflete, por um lado, a necessidade contínua de água que o Homem apresenta, e por outro, a capacidade limitada de acumulação no seu corpo. Apesar do corpo humano e das células vivas em geral, serem constituídas maioritariamente por água (65 a 75%), quando se perde cerca de 15% dessa quantidade, o corpo entra numa situação de desidratação. A necessidade diária do Homem em relação à água é de dois a três litros, que podem ser fornecidos sob a forma de água e outros líquidos, ou contidos nos alimentos (Gleick, 1993; Mendes e Oliveira, 2004;).

Sem água, a vida no planeta Terra morreria. No entanto, é importante ter a noção de que a disponibilidade de água no planeta não é igual, quer do ponto de vista da quantidade, quer da qualidade. Para além de este recurso estar globalmente mal distribuído, nem todas as suas variantes são úteis para sustentar o consumo atual das diferentes atividades antropogénicas. De toda a água presente na Terra, sabemos que pouco mais de 2,5% é doce e, dessa pequena porção cerca de 99% está no estado sólido, como gelo nas calotes polares e neve no cume das montanhas, ou em aquíferos. Os rios e os lagos totalizam pouco mais de 22% do total de água doce à superfície, 0,0072% do total na Terra, sendo esta quantidade insuficiente para satisfazer as necessidades de consumo atuais (Gleick, 1993; Mendes e Oliveira, 2004; Victorino, 2007). No entanto, deve ser salientado que estes valores podem no futuro sofrer alteração, dado que em

Março do presente ano foi publicado um estudo na *Nature*, no qual os investigadores descrevem a descoberta de água num mineral, chamado ringwoodite, que pode existir no manto (a camada da Terra que fica abaixo da crosta terrestre) [I]. A grande novidade desta descoberta, caso a amostra seja representativa de toda a parte inferior da zona de transição do manto, zona onde a ringwoodite é estável, é que este mineral permite inferir a existência de um reservatório de água no manto terrestre equivalente à água de todos os oceanos da Terra [I].

#### **1.4. Contaminação da água: causas e efeitos**

Para além da problemática associada ao aumento do consumo de água doce, da sua escassez e má distribuição geográfica, há ainda a questão da sua contaminação. Com a revolução industrial, e todo o desenvolvimento daí resultante, cada vez mais elementos tóxicos foram contaminando as bacias hidrográficas que alimentam, direta ou indiretamente, as populações (Gleick, 1993; Mendes e Oliveira, 2004).

A proveniência de elementos tóxicos para a água pode ter origem natural ou antropogénica. As fontes naturais incluem a deposição desses elementos da atmosfera (incêndios, poeiras vulcânicas, etc) por ação do vento ou da chuva, a biodegradação da vegetação do meio envolvente, a erosão das rochas, ou a lixiviação natural. A chuva dissolve alguns elementos/compostos presentes no ar e arrasta a matéria particulada. Um exemplo disso é a ocorrência das chuvas ácidas, formadas devido à dissolução de gases acidificados, como óxidos de enxofre e nitrogénio, na água da chuva. Por outro lado, a biodegradação da vegetação e os dejetos de animais podem fornecer nutrientes, principalmente nitrogénio e fósforo, que podem entrar em rios, lagoas e pequenos lagos (Gleick, 1993; Goel, 2006).

No entanto, as fontes antropogénicas são as que causam maior preocupação e podem ter diferentes origens, como agrícola, doméstica ou industrial. As fontes de origem agrícola devem-se geralmente à lixiviação de elementos/compostos de campos agrícolas e/ou da pecuária. Com o objetivo de manter e/ou aumentar o ritmo de produção de cereais e outros produtos agrícolas, tornou-se indispensável adubar os terrenos e controlar as pragas. Por exemplo, os adubos são compostos ricos em nitrogénio e fósforo, essencialmente na forma de nitratos e fosfatos, facilmente lixiviados pela rega e chuva, sendo posteriormente introduzidos nos rios e lençóis freáticos, onde serão usados como alimento para algas, bactérias, plâncton e outros produtores primários. Dependendo da

sua quantidade, estes elementos poderão desencadear processos de eutrofização, tornando a quantidade de matéria orgânica na coluna de água excessiva, enquanto a quantidade de oxigênio dissolvido é reduzida (Goel, 2006).

Os resíduos industriais têm elevado potencial para deteriorar a qualidade da água, pois tendem a ter um grande número de contaminantes, desde nutrientes, matéria orgânica, metais e outras substâncias tóxicas. Os resíduos das indústrias como as de papel e celulose, e refinarias, são fontes de matéria orgânica. As indústrias de revestimento com metais libertam quantidades substanciais de metais e cianeto nos seus resíduos. As refinarias de petróleo têm resíduos com elevada carência bioquímica de oxigênio, fenóis, óleos e sulfuretos, assim como outras substâncias tóxicas. O setor de extração de matérias-primas contribui para a libertação de poeiras e outros detritos para o ar e para a lixiviação de contaminantes, quer devido à extração da matéria-prima da fase inerte quer devido aos químicos usados na extração dos minérios. É principalmente desta atividade que surgem problemas de contaminação por metais, como o mercúrio, cádmio, zinco e chumbo, e por muitos outros contaminantes que são encontrados em concentrações elevadas nas minas, como arsénio ou ácido sulfúrico (Goel, 2006).

A maior parte dos contaminantes pode transmitir às águas cor, sabor e cheiro, fazendo com que estas não se adequem ao consumo doméstico (Zuane, 1997). As alterações na quantidade de oxigênio, na temperatura e pH afetam as características químicas da água, provocando muitas vezes reações que resultam na formação de produtos não desejados. Por outro lado, a descarga de matéria orgânica resulta na diminuição de oxigênio e conseqüentemente no aumento de dióxido de carbono devido à degradação anaeróbia da matéria orgânica por bactérias. A decomposição excessiva de matéria orgânica, quando ocorre na ausência de oxigênio, resulta em más condições odoríferas devido à acumulação de muitos gases desagradáveis como é o caso da amónia, sulfureto de hidrogénio e metano. Paralelamente, as algas ao realizarem a fotossíntese consomem o dióxido de carbono existente na água aumentando o pH da água (Goel, 2006; Zuane, 1997).

Para além das substâncias químicas, os efluentes também podem conter muitos microrganismos, patogénicos e não patogénicos. O *Clostridium perfringens* e o *Streptococcus faecalis* causam diversos tipos de envenenamento. Para além disso, muitas doenças transmitidas pela água como a cólera, febre tifóide, leptospirose, hepatite infecciosa, esquistossomose e diarreia infecciosa, devem-se ao consumo de água contaminada (Goel, 2006; Mendes e Oliveira, 2004).

Para além dos efeitos biológicos manifestados nos peixes e restante biota, a contaminação da água leva também a efeitos tóxicos, e muitas vezes os elementos tóxicos acumulam-se nos organismos e transferem-se ao longo dos níveis tróficos (Goel, 2006; Mendes e Oliveira, 2004).

Os metais são dos contaminantes mais preocupantes, uma vez que é impossível eliminar por completo a sua emissão e, mesmo em baixas concentrações, podem ser extremamente tóxicos. Na maioria dos casos não é a ingestão direta de água contaminada que provoca o dano, mas sim a sua incorporação gradual ao longo do tempo na cadeia trófica, ou seja, os organismos acumulam nos tecidos metais e outras toxinas em quantidades superiores às que se encontram no meio envolvente. Este problema agrava-se a cada nível trófico, pelo processo de bioacumulação e bioamplificação (Wang et al., 2004). Uma vez que o Homem está no topo da cadeia alimentar, é um dos seres vivos mais afetados pelo processo de bioamplificação (Goel, 2006). Assim, recorre-se a listas de contaminantes potencialmente perigosos e legislam-se limites máximos recomendados para águas com diferentes propósitos, criando-se critérios de qualidade ambiental, consumo e segurança. Na Tabela 1 encontram-se alguns dos contaminantes enumerados na *Priority List of Hazardous Substances* (Lista prioritária de substâncias perigosas) e o respetivo grau de perigo (ranking 2011), segundo a ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) [II].

**Tabela 1** – Lista de contaminantes controlados e respetivo grau de perigosidade de acordo com a ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) [II].

Ranking 2011	Substância
1	Arsénio
2	Chumbo
3	Mercúrio
7	Cádmio
57	Níquel
120	Metilmercúrio
125	Cobre
140	Manganês
181	Alumínio

O grau de perigosidade, para além da toxicidade do contaminante, tem em conta as quantidades libertadas e a facilidade de exposição. Nesta tabela verifica-se que o mercúrio se encontra entre as substâncias mais perigosas, tópico esse que será desenvolvido posteriormente.

## **1.5. Parâmetros de avaliação da qualidade da água - evolução histórica**

Na natureza, a água pode apresentar, em solução ou em suspensão, substâncias estranhas que condicionam a sua utilização. Assim, surge a necessidade de associar à quantificação dessas substâncias, a indicação da qualidade da água, ou seja, aquilo que a caracteriza, ou mesmo a sua adaptabilidade para o uso que se lhe quer dar.

A preocupação com a qualidade da água embora seja um problema muito atual esteve sempre intrínseca à existência do ser humano. Ao longo da nossa evolução, os recursos hídricos passaram a ser valorizados não só pela sua capacidade de satisfazer as necessidades das atividades antropogénicas que deles dependem, mas também pela qualidade que este bem apresenta, nomeadamente em relação aos parâmetros organoléticos (aparência, cheiro e sabor), como é referenciado em documentos datados de 4000 a.C. (EPA, 2000).

Por volta do ano 1500 a.C., no Egipto, a problemática da “nebulosidade visível”, atualmente parâmetro denominado por turvação, era resolvida com a utilização de sulfato de alumínio, uma vez que nesta região a água apresentavam elevado teor de partículas em suspensão, as quais eram relacionadas com sabor e aparência desagradáveis. Este facto revela que poderá ter sido esta a civilização pioneira no desenvolvimento de sistemas de tratamento de águas (EPA, 2000).

Também na civilização grega se verificou o desenvolvimento e sistematização de processos de tratamento da água como a “filtração através de carvão, exposição à luz, peneiração e fervura”, de acordo com as características da água bruta e a sua utilização (EPA, 2000).

No século V a.C. o médico Hipócrates desenvolveu a “luva de Hipócrates”, que não era mais que um saco de pano, através do qual se realizava a filtração, pois nessa época a água considerava-se potável quando se apresentava límpida e translúcida, ou seja na ausência de sólidos em suspensão (Hall e Dietrich, 2000).

A civilização romana foi a primeira a construir um sistema de abastecimento de água, tendo este sido construído entre 343 a.C. e 225 d.C. na cidade de Roma, com o objetivo de satisfazer as necessidades das famílias mais abastadas. Contudo, o único tipo de tratamento que este sistema apresentava, embora de uma forma accidental, era uma desinfecção por ação da luz solar, uma vez que a água era transportada em canais abertos (Hall e Dietrich, 2000; IDEM, 2003). Outras cidades como Veneza apresentavam

sistemas de recolha de águas pluviais provenientes dos telhados e pátios, a qual era filtrada em filtros de areia e encaminhada para reservatórios para posterior utilização (IDEM, 2003).

Na década de 80 do século XIX foi construído o primeiro filtro rápido em Somerville, New Jersey (Almeida, 2005). Contudo, este tipo de filtração por si só não garantia uma redução dos microrganismos. Em 1908, na cidade de Jersey, em New Jersey, foi instalado o primeiro sistema de desinfecção por cloro, usando hipoclorito de cálcio, com base nos resultados satisfatórios obtidos na Grã-Bretanha relativos à redução de mortes por febre tifóide (EPA, 2000; IDEM, 2003). Nesta mesma época, na Europa, o desinfetante utilizado era o ozono, tendo sido a sua primeira aplicação efetuada em Nice, França. Contudo esta tecnologia foi considerada complexa e dispendiosa nos Estados Unidos da América e só décadas mais tarde foi adotada (EPA, 2000; IDEM, 2003).

No ano de 1914, os Serviços de Saúde Pública dos Estados Unidos da América, introduziram as primeiras normas de qualidade de água para consumo humano. Estas normas apenas englobavam parâmetros bacteriológicos e tinham como objetivo garantir a qualidade da água relativamente aos microrganismos causadores de doenças contagiosas. Posteriormente, nos anos de 1925, 1946 e 1962 verificou-se um aumento significativo do número de parâmetros de controlo de qualidade da água (EPA, 2000; IDEM, 2003).

Na década de 60 do século XX, os parâmetros físicos, microbiológicos e químicos até então considerados pelo Serviço de Saúde Pública deixaram de ser suficientes para garantir a qualidade da água para consumo humano. Este facto deveu-se ao desenvolvimento industrial e agrícola, que introduziu novos compostos químicos, que tiveram um impacto negativo a nível ambiental e de saúde pública. Embora nesta época já fossem utilizadas técnicas de tratamento da água, como o arejamento, floculação e adsorção em carvão ativado, estas não eram suficientemente eficazes para garantir a remoção dos novos compostos que passaram a existir na água, provenientes de descargas não controladas, escorrências superficiais e percolação através dos solos (EPA, 2000).

Nos Estados Unidos da América, em 1974, surge o “*Safe Drinking Water Act*”, com o objetivo de estabelecer normas de qualidade de água para consumo humano, sob a responsabilidade da *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) – *Office of Ground Water and Drinking Water* (EPA, 2000).

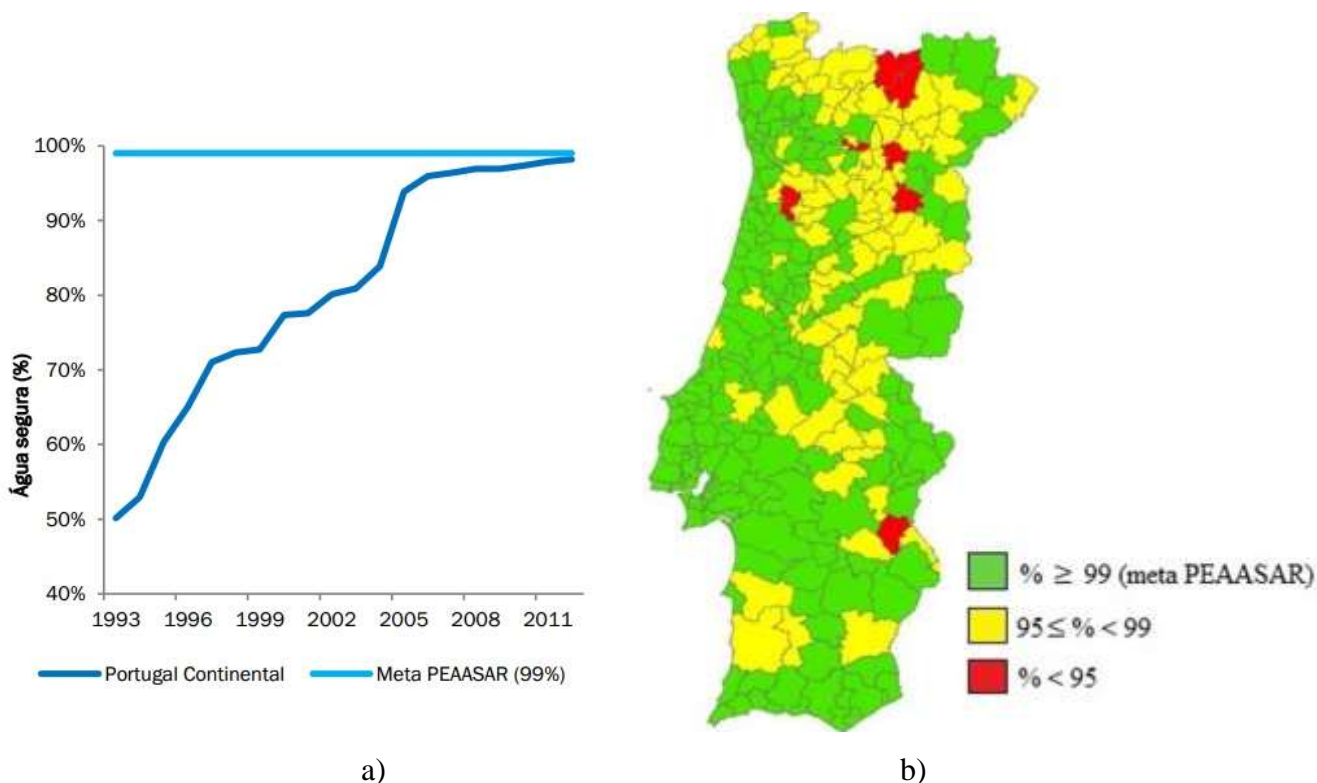
No ano seguinte são estabelecidos dezoito parâmetros de análise da água, de modo a criar um padrão de qualidade de água para consumo humano. Os parâmetros analisados

eram seis compostos químicos orgânicos sintéticos, dez químicos inorgânicos, turvação e coliformes totais. O número de parâmetros a analisar tem vindo sucessivamente a ser alargado, uma vez que o número de parâmetros utilizados para apreciação de qualidade da água, assim como os seus valores limites, são função da evolução do conhecimento científico e tecnológico (EPA, 2000).

A partir da década de 80, na Europa, surgiram outras preocupações nos sistemas de tratamento de água para consumo humano, relacionadas com a remoção de carbono orgânico total, contaminantes orgânicos sintéticos e com os efeitos na saúde pública dos subprodutos da desinfecção. Deste modo, verificou-se uma evolução nas linhas de tratamento de águas destinadas a consumo, tornando-se estas mais complexas e apresentando uma sequência de processos e operações unitárias, tais como pré-oxidação, coagulação, floculação, decantação, filtração, pós-oxidação, filtração em carvão ativado e desinfecção, que passaram a ser aplicados consoante a origem da captação de água e a presença dos compostos anteriormente referidos (Almeida, 2005).

Em Portugal, tem-se verificado uma evolução muito positiva, quer quanto à qualidade da água distribuída, quer quanto à realização de um maior número de análises obrigatórias para o seu controlo. A Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos disponibiliza dados globais, ao nível de Portugal Continental, relativos ao controlo da qualidade da água efetuado em 2012 para a água que chega à torneira do consumidor. Os últimos dados nacionais conhecidos não deixam dúvidas sobre o assunto, evidenciando uma clara melhoria no controlo da qualidade da água na última década (Figura 1.a). Esta situação requer, no entanto, um investimento adicional em ações e medidas que permitirão atingir a meta do Plano Estratégico de Abastecimento de Água e Saneamento de Águas Residuais 2007-2013 (PEAASAR II) de 99% para o indicador Água Segura (água controlada e de boa qualidade), correspondente a 100% de análises realizadas e 99% de cumprimento dos valores paramétricos especificados na legislação (Figura 1.b) [III].





**Figura 1** – a) Evolução do indicador água segura em Portugal Continental b) Percentagem de água segura em Portugal continental [III].

### 1.5.1. Legislação sobre qualidade da água

A gestão dos recursos hídricos na Europa rege-se pelos princípios que se encontram especificados na Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000, designada por Diretiva Quadro da Água, e que tem como objetivos primordiais a utilização sustentável da água, a eficiência na sua utilização, o melhoramento dos ambientes aquáticos e a mitigação dos efeitos das inundações e secas.

O Decreto-Lei nº 306/2007 estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização universal de água salubre, limpa e equilibrada na sua composição. A água não deve conter nenhum microrganismo, parasita ou substância em quantidade ou concentração que possa constituir um perigo potencial para a saúde humana e deve cumprir as normas de qualidade fixadas no Anexo I do Decreto-Lei nº 306/2007 [IV].

Segundo o artigo 2º do Decreto-Lei nº 306/2007, entende-se por água destinada ao consumo humano, toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser

bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem ou meio de fornecimento. Para além disso, segundo o artigo 6º do mesmo decreto relativo às normas de qualidade, a água destinada ao consumo humano deve respeitar os valores paramétricos dos parâmetros constantes no Anexo I (Tabela 2), ou seja, respeitar cada valor máximo ou mínimo fixado para cada parâmetro a controlar. Quando a proteção de saúde humana assim o exija, a Direção Geral de Saúde (DGS) fixa os valores aplicáveis a outros parâmetros [IV].

**Tabela 2** – Valores paramétricos relativos a alguns parâmetros químicos, microbiológicos e indicadores na água destinada ao consumo humano (Anexo I do Decreto-Lei nº306/2007) [IV].

<b>Parâmetros químicos</b>	<b>Valor paramétrico</b>	<b>Unidade</b>
Antimónio	5,0	µg/L
Arsénio	10	µg/L
Cobre	2,0	mg/L
Chumbo	10	µg/L
Mercúrio	1	µg/L
Níquel	20	µg/L
Cádmio	5,0	µg/L
Fluoretos	1,5	mg/L
Nitratos	50	mg/L
Nitritos	0,5	mg/L
<b>Parâmetros microbiológicos</b>	<b>Valor paramétrico</b>	<b>Unidade</b>
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	0	*
		**
<i>Enterococos</i>	0	*
		**
<b>Parâmetros indicadores</b>	<b>Valor paramétrico</b>	<b>Unidade</b>
Alumínio	200	µg/L
Amónio	0,50	mg/L
Cloretos	250	mg/L
Cor	20	mg/L PtCo
Condutividade	2500	µS/cm a 20°C
pH	≥6,5 e ≤9	Unidades de pH
Oxidabilidade	5	mg/L O <sub>2</sub>
Sulfatos	250	mg/L
Carbono orgânico total (COT)	Sem alteração anormal	mg/L
Manganês	50	µg/L

\* Para água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição (Número/100 mL)

\*\* Para água colocada à venda em garrafas (Número/250 mL)

Existem determinados cuidados a ter nos materiais e produtos em contato com a água. As entidades gestoras não devem utilizar materiais que, em contato com a água para consumo humano, possam provocar alterações que impliquem a redução do nível de proteção da saúde humana. As substâncias e os produtos químicos utilizados no tratamento da água para consumo humano, bem como quaisquer impurezas que eventualmente possuam, não devem estar presentes na água distribuída nem originar, direta ou indiretamente, riscos para a saúde humana [IV].

Na Tabela 2, apresentam-se os valores paramétricos relativos a alguns parâmetros indicadores e parâmetros químicos e microbiológicos na água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição ou posta à venda em garrafas ou outros recipientes. Na Tabela 2 estão destacados a maioria dos parâmetros estudados na análise de água destinada ao consumo humano no Laboratório Luságua, assim como os metais com maior grau de perigosidade de acordo com a ATSDR e referidos na Tabela 1.

O Anexo II do Decreto-Lei nº 306/2007 tem por objetivo definir os controlos de rotina e inspeção, assim como as frequências de amostragem (Tabelas 3, 4 e 5), para a análise da água destinada ao consumo humano, tanto fornecida pelos sistemas de abastecimento, como à venda em garrafas e outros recipientes.

**Tabela 3** – Frequência mínima de amostragem e de análise da água destinada a consumo humano fornecida por uma rede de distribuição.

Tipo de Controlo	Parâmetro	Volume de água fornecida na zona de abastecimento (m <sup>3</sup> /dia)	Nº de amostras por ano
Controlo de rotina I	<i>E. coli</i>	<100	6
	Bactérias coliformes	≥ 100	12/5000 hab
Controlo de rotina II	Alumínio	<100	2
	Amónio		
	Condutividade	>100 e ≤1000	4
	Oxidabilidade	>1000	4 + 3 por cada 1000 m <sup>3</sup> /dia + 3 por fração remanescente do volume total
	pH		
	Cor		
	Manganês		
	Nitratos		
Controlo de Inspeção	Antimónio	≤1000	1
	Arsénio		
	Cobre	>10000 e ≤100000	3+1 por cada 10000 m <sup>3</sup> /dia +1 por fração remanescente do volume total.
	Chumbo	>100000	10 +1 por cada 25000 m <sup>3</sup> /dia e fração remanescente do volume total
	Mercúrio		
	Cádmio		
	Fluoretos		
	Níquel		

O controlo de rotina tem como objetivo fornecer regularmente informações sobre a qualidade organolética (controlo de rotina II) e microbiológica (controlo de rotina I) da água destinada ao consumo humano, bem como da eficácia dos tratamentos existentes, especialmente a desinfecção, tendo em vista determinar a conformidade da água com os valores paramétricos. O controlo de inspeção tem como objetivo obter as informações necessárias para verificar o cumprimento dos valores paramétricos [IV].

**Tabela 4** – Frequência mínima de amostragem e de análise da água destinada a consumo humano fornecida por uma entidade gestora em alta\*.

Volume de água fornecida em alta (m <sup>3</sup> /dia)	Controlo de rotina I	Controlo de rotina II	Controlo de inspeção
≤250	2	2	1
>250 e ≤1000	6	2	1
>1000 e ≤2000	12	4	1
>2000 e ≤5000	18	6	1
>5000 e ≤15000	24	8	2
>15000 e ≤25000	72	24	4
>25000 e ≤50000	104	36	4
>50000 e ≤100000	156	52	6
>100000	365	104	12

\*Entende-se por entidade gestora de sistema de abastecimento público em alta, a entidade responsável por um sistema destinado, no todo ou em parte, ao represamento, à captação, à elevação, ao tratamento e armazenamento de água para consumo público.

**Tabela 5** – Frequência de amostragem e análise de águas colocadas à venda em garrafas.

Volume de água produzida (m <sup>3</sup> /dia)	Controlo de rotina I e II Nº de amostras por ano	Controlo de Inspeção Nº de amostras por ano
≤10	1	1
>10 e ≤60	12	1
>60	1 por cada 5 m <sup>3</sup> e fração remanescente para o volume total	1 por cada 100 m <sup>3</sup> e fração remanescente para o volume total

Na Tabela 6, são indicados alguns parâmetros para os quais são especificadas as características de desempenho dos métodos analíticos a utilizar. Estas devem, no mínimo, ser capazes de medir concentrações iguais ao valor paramétrico com a exatidão, a precisão e os limites de deteção especificados [IV]. Na Tabela 6 estão também especificados os

métodos analíticos de referência para a análise dos diferentes parâmetros em águas para consumo humano, com base no Decreto-Lei nº236/98, nomeadamente no Anexo VI [V].

**Tabela 6** – Caraterísticas de desempenho dos métodos analíticos utilizados na análise de água destinada ao consumo humano [IV].

Parâmetros	Exatidão (% do valor paramétrico)	Precisão (% do valor paramétrico)	Limite de deteção (% do valor paramétrico) *	Método analítico de referência [V]
Alumínio	10	10	10	Espectroscopia atómica Espectrometria de absorção molecular
Antimónio	25	25	25	Espectrometria de absorção molecular
Cobre	10	10	10	Espectroscopia atómica Espectrometria de absorção molecular
Ferro	10	10	10	Espectroscopia atómica Espectrometria de absorção molecular
Chumbo	10	10	10	Espectroscopia atómica
Magnésio	10	10	10	Espectroscopia atómica
Manganês	10	10	10	Espectroscopia atómica Espectrometria de absorção molecular
Merúrio	20	10	10	Espectroscopia atómica
Níquel	10	10	10	Espectroscopia atómica
Arsénio	10	10	10	Espectroscopia atómica Espectrometria de absorção molecular
Cádmio	10	10	10	Espectroscopia atómica
Cálcio	10	10	10	Espectroscopia atómica Complexometria
Cloretos	10	10	10	Volumetria (método de Mohr) Espectrometria de absorção molecular
Condutividade	10	10	10	Eletrometria
Fluoretos	10	10	10	Eléktrodos específicos Espectrometria de absorção molecular
Nitratos	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular Eléktrodos específicos
Nitritos	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular
Oxidabilidade	25	25	10	Oxidação com $\text{KMnO}_4$ à ebulição durante dez minutos; meio ácido

\*O limite de deteção é igual a três vezes o desvio padrão relativo no interior de cada lote de uma amostra experimental contendo uma baixa concentração do parâmetro ou cinco vezes o desvio padrão no interior de cada lote da amostra de controlo.

## **1.6. O mercúrio como contaminante da água**

O mercúrio é conhecido pelo Homem há centenas de milhares de anos. Weinheim (1991) afirma que o uso do mercúrio com fins medicinais pode ser datado desde cerca de 3000 anos atrás. Existem indicações de que este metal era usado na forma de cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) para curar doenças venéreas e na forma de sulfureto de mercúrio ( $\text{HgS}$ ) como tinta de escrita, na China ca. 2000 a.C. Na Índia, diversos compostos de mercúrio era conhecidos como remédios desde 500 a.C. (Hamre, 1993).

O símbolo químico do mercúrio deriva do termo hydrargyrum (água grega) ( $\eta\psi\delta\sigma\rho$ ) e prata ( $\alpha\rho\psi\rho\delta$ ) usados pelos romanos. O mercúrio tem tido um uso generalizado extração de metais preciosos através de amalgamação. Com este fim, os Espanhóis levaram grandes quantidades de mercúrio para o “Novo Mundo” e trouxeram prata de volta. Em diversas culturas do “Novo Mundo”, entre as quais os Maias, o mercúrio tinha uma importância ritual, e era usado na luta contra forças demoníacas (Austin, 1994).

Em 1553, Paracelsus foi o primeiro a descrever o envenenamento por mercúrio de trabalhadores de minas de mercúrio, como sendo uma doença ocupacional. A quantidade de referências de casos por envenenamento com mercúrio entre trabalhadores de diferentes ocupações aumentou entre os séculos XVIII e XIX. Paralelamente, o mercúrio foi introduzido num número cada vez maior de aplicações como anticéptico e na quimioterapia (Weinheim, 1991).

Durante séculos, os cientistas não diferenciaram o mercúrio nas suas diferentes formas químicas apesar das diferenças nas suas propriedades. Em 1852, Edward Frankland reportou o primeiro composto de mercúrio orgânico ( $\text{CH}_3\text{HgI}$ ). Três dos seus colaboradores morreram em resultado da inalação deste composto durante esta descoberta e até ao início do século seguinte muito pouca pesquisa foi realizada nos compostos de mercúrio orgânico. Atualmente, estes compostos orgânicos são conhecidos como sendo extremamente tóxicos.

### **Fontes naturais e antropogénicas**

O mercúrio existente no ambiente pode ter origem natural e antropogénica. As principais fontes de mercúrio para o ambiente (ar, água, solo e sedimentos) podem ser agrupadas em quatro categorias (Bose et al., 2010; Carpi, 1997; EPA, 2006; Liu et al., 2011; Wang et al., 2004): fontes de ocorrência natural, como a atividade vulcânica e

erosão e degradação das rochas; reemissão de mercúrio que foi previamente depositado através de processos naturais e/ou antropogênicos, em solos, sedimentos, água, aterros sanitários e em depósitos de resíduos; disseminação na atmosfera, devido à queima de combustíveis fósseis e à fundição de metais como o ouro e o zinco; descarga devido ao uso de mercúrio em produtos e processos de manufatura.

O mercúrio raramente aparece livre na natureza e encontra-se principalmente na forma de um minério, denominado por cinábrio (HgS). É geralmente por aquecimento do cinábrio, seguido de condensação (Equação 1) (Micaroni et al., 2000), que se obtém o mercúrio líquido.



Existem fontes antropogênicas que são relevantes para muitas das emissões atmosféricas, e que contribuem consideravelmente para o ciclo do mercúrio, nomeadamente: combustão de carvão; mineração e produção de metais; fabrico de cloro e soda; combustão ou incineração de resíduos que contêm mercúrio (Bose et al., 2010; EPA, 2006; Mendes e Oliveira, 2004). O Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP – *United Nations Environmental Program*) estima que o total das emissões para a atmosfera de mercúrio (tanto de fontes antropogênicas como fontes naturais) varie entre 4400 e 7500 toneladas por ano, enquanto a Agência de Proteção Ambiental (EPA – *Environmental Protection Agency*) estima que 50 a 70% das emissões atmosféricas provenientes de fontes antropogênicas advenham da queima de combustíveis fósseis, principalmente na China, Índia e em outros países asiáticos.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO- *World Health Organization*), os níveis de mercúrio presentes na água da chuva podem variar entre 5 e 100 ng/L. Os níveis de mercúrio que ocorrem naturalmente em águas subterrâneas e superficiais são inferiores a 0,5 µg/L, embora depósitos de minerais locais possam originar níveis mais elevados nas águas subterrâneas.

### **Toxicidade do mercúrio e exposição humana**

O desastre ambiental mais relevante que expôs os efeitos tóxicos do mercúrio ocorreu em 1953 na Baía de Minamata, no sudoeste do Japão. Uma indústria química da Chisso Corporation utilizava sulfato de mercúrio como catalisador para a produção de

ácido acético e derivados, e cloreto de mercúrio como catalisador na produção de cloreto de vinilo, sendo o metilmercúrio um produto secundário na síntese do acetaldeído. O metilmercúrio presente no efluente, que era descarregado diretamente na baía, contaminou a biota marinha e a água, chegando até a população através do consumo de peixes e marisco. A “Doença de Minamata” foi oficialmente descoberta em 1956, quando uma criança foi hospitalizada com mãos e pés paralisados. Desde 1953, foram observados diversos efeitos, como o entorpecimento dos dedos, lábios e língua de diversas pessoas, morte de peixes, e de outros animais. Cerca de 20% da população de Minamata morreu e muitos sobreviventes ficaram permanentemente incapacitados. Em 1968, o uso de mercúrio na produção de acetaldeído foi interrompida.

Os casos de toxicidade devido à ingestão accidental de mercúrio metálico (por exemplo, resultante da rutura de um termómetro) são raros. Este facto é justificável pela pequena absorção deste metal no trato gastrointestinal. Com uma exposição crónica ao vapor de mercúrio, os efeitos principais que se observam, são ao nível do sistema nervoso central (Holmes et al., 2009). Este tipo de exposição ocorre principalmente nos mineiros, dentistas e trabalhadores que tenham contato com o mercúrio. Nestas situações, os principais sintomas apresentados variam desde tremores até distúrbios psicológicos e podem também levar a danos no sistema imunológico. Uma vez absorvido, o mercúrio elementar é distribuído pelos tecidos ricos em gordura (Bose et al., 2010; Syversen et al., 2012).

No nosso corpo, cerca de 7 a 8% do mercúrio ingerido através dos alimentos é absorvido; a absorção do mercúrio ingerido pela água ronda os 15% ou menos, dependendo do composto (WHO, 2005). Na forma orgânica, os compostos de mercúrio (por exemplo o metilmercúrio) podem entrar na corrente sanguínea, causando danos irreparáveis no sistema nervoso central. Devido ao facto de ser lipofílico, o mercúrio é transferido através da placenta, expondo o feto e causando-lhe problemas neurológicos e má formação cefálica (Syversen et al., 2012). A lipossolubilidade dos compostos de mercúrio orgânico também facilita a sua passagem através dos tecidos, sendo que estes compostos também podem ser absorvidos pela pele e pelo trato gastrointestinal (Syversen et al., 2012).

Na água potável, o teor em mercúrio é geralmente reduzido (0,01 a 0,03 µg/L), mas podem encontrar-se, eventualmente, teores mais elevados, quando se utilizam canalizações de plástico, onde este metal é utilizado. Nestas águas, a forma mineral é



predominante e, dada a sua baixa assimilabilidade, são raras as intoxicações por mercúrio através da água (Holmes et al., 2009; Syversen et al., 2012; WHO, 2005).

Segundo a EPA, a dose máxima tolerável para o Homem é de  $0,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  para o mercúrio elementar e  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/dia para o metilmercúrio [VI].

### **1.6.1. Lavagem dos frascos, preservação e pré-tratamento das amostras de água para a quantificação de mercúrio**

Devido às concentrações de mercúrio nas águas serem extremamente baixas, os reagentes usados e os recipientes de armazenamento podem contaminar a amostra, conduzindo à obtenção de resultados erróneos.

Além do risco de contaminação, a elevada volatilidade de algumas espécies de mercúrio ( $\text{Hg}^0$  e dimetilmercúrio) e a elevada afinidade do mercúrio elementar e inorgânico para a sorção à superfície e/ou a sua permeabilidade através de alguns materiais podem resultar em perdas de analito. Para além disso, também a conversão entre as espécies de mercúrio tem de ser evitada durante a colheita/amostragem, pré-tratamento e armazenamento (Leopold et al., 2010).

Um armazenamento adequado requer recipientes de politetrafluoretileno (PTFE), politereftalato de etileno (PET) ou de vidro. Para a reutilização dos recipientes de PTFE e de vidro, existem procedimentos de limpeza muito rigorosos, como por exemplo, a lavagem ácida ou com cloreto de bromo. No caso dos recipientes de PET, como são relativamente baratos, por norma não são reutilizados. Os frascos devem ser tapados hermeticamente para que não haja difusão do mercúrio atmosférico (Leopold et al., 2010).

Um dos procedimentos comuns de lavagem de todo o material utilizado na amostragem, transporte, armazenamento e análise das amostras recolhidas, passa pela sua lavagem prévia em água corrente, seguido da sua imersão em detergente Decon, durante 24 horas. Após este período o material é enxaguado com água e em seguida é imerso em  $\text{HNO}_3$  a 25%, durante cerca de 24 horas, sendo posteriormente passado várias vezes por água ultra-pura abundante (Ramalhosa, 2002). A secagem do material pode ser feita em estufa ou ao ar, tapado com folhas de papel, para evitar contaminações, nomeadamente por deposição de poeiras. Todo o material deve ser posteriormente guardado em sacos de polietileno fechados (Pereira, 1996; Ramalhosa, 2002). O protocolo recomendado pelo método 245.7 da EPA e referido por Leopold et al. (2010) para a limpeza de frascos de

vidro envolve os seguintes passos: enxaguar muito bem os frascos com HCl; enchê-los com solução de KBr a 10% durante 24 horas; após esse período lavar com água ultra pura; levá-los a alta temperatura por pelo menos 12 horas; arrefecer à temperatura ambiente, fechá-los e guardá-los em sacos de plástico num local limpo até serem usados.

Para a análise de mercúrio dissolvido, as amostras de águas naturais são filtradas após a colheita. Os filtros podem ser de PTFE, polycarbonato, nylon, quartzo ou fibra de vidro e porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Na determinação de mercúrio dissolvido devem-se sempre preparar brancos, através da filtração de água ultra-pura nas mesmas condições em que as amostras são filtradas.

A preservação das amostras é feita após a filtração pela adição de ácido (HCl ou  $\text{HNO}_3$ ) ou de um oxidante, como o KBr ou o dicromato de potássio. Com este procedimento, as amostras são estáveis durante 28 dias após a colheita (Leopold et al., 2010). Os frascos com as amostras devem ser guardados em sacos de plástico até à sua análise (Leopold et al., 2010).

Para a determinação da concentração de mercúrio total em águas, todos os compostos de mercúrio devem ser convertidos em  $\text{Hg}^{2+}$ . O pré-tratamento é feito através de oxidação química, que oxida a matéria orgânica e converte os compostos de Hg na forma oxidada,  $\text{Hg}^{2+}$ , de modo a ficarem disponíveis para serem reduzidos pelo cloreto estano e posteriormente quantificados. Uma variedade de combinações de ácidos fortes (HCl,  $\text{HNO}_3$ ), oxidantes ( $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), temperaturas elevadas, radiação ultravioleta e exposição a microondas têm sido usadas e recomendadas [VIII].

Alguns trabalhos referem que o cloreto estano na presença de um catalisador (ião metálico) também é capaz de reduzir os compostos de Hg presentes, não havendo necessidade de se efetuar oxidação [VIII].

Com a finalidade de aumentar a capacidade de detecção, diversas técnicas de concentração têm sido desenvolvidas. A técnica mais comum, extração em fase sólida, consiste em utilizar colunas constituídas por uma fase estacionária com afinidade para os compostos de Hg, sendo estes posteriormente eluídos com um solvente apropriado. Esta técnica demonstra ser fácil de manipular, tem baixo consumo de solvente e é facilmente acoplado ao UV-Vis, ICP-MS, ICP-OES e CV-AFS. No entanto, a eluição é muito lenta (Yin et al., 2012).

## **1.7. Quantificação de mercúrio em águas de consumo humano - principais técnicas**

A espectroscopia atômica é a técnica mais utilizada para a determinação de mercúrio em águas de consumo. Esta técnica pode funcionar por emissão, absorção ou fluorescência atômica, com atomizadores de chama, câmara de grafite, vapor frio ou plasma. Um dos primeiros atomizadores a ser utilizado em conjunto com a espectroscopia de absorção e fluorescência atômica foi o de chama. No entanto, este é pouco sensível para a determinação de mercúrio, e além disso, podem haver interferências provenientes dos gases utilizados pela chama, como a supressão de fluorescência ou ruído de fundo elevado. Assim, esta técnica de atomização tornou-se desaconselhável para a determinação de mercúrio (Harris, 2008).

Segundo a EPA, os métodos mais apropriados e que são utilizados atualmente são a espectroscopia de absorção (CV-AAS) (método 245.1 [VII]) e espectroscopia de fluorescência (CV-AFS) (método 245.7 [VIII]) acoplados com atomizador de vapor frio. Dada a elevada volatilidade do mercúrio, não há necessidade de equipamentos adicionais para ocorrer atomização (Micaroni et al., 2000). Além disso, estas técnicas têm a vantagem de não ser necessária a pré-concentração da amostra.

Na literatura são ainda mencionados outros sistemas de detecção para o Hg como a espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP-AES) (Reuther et al., 1999); detecção de emissão de plasma (PED) (Bettmer et al., 1995); detecção por captura eletrônica (ECD) (Wasik et al., 1998); plasma de indução acoplado a espectrometria de massa (ICP-MS) (Chen et al., 2009); plasma de indução acoplado a espectrometria de emissão ótica (ICP-OES) (Cervený et al., 2013; Zhu et al., 2008); métodos eletroquímicos (Cervený et al., 2013; Gao e Huang, 2013; Martín-Yerga et al., 2013); espectroscopia de UV-Vis (Yin et al., 2012).

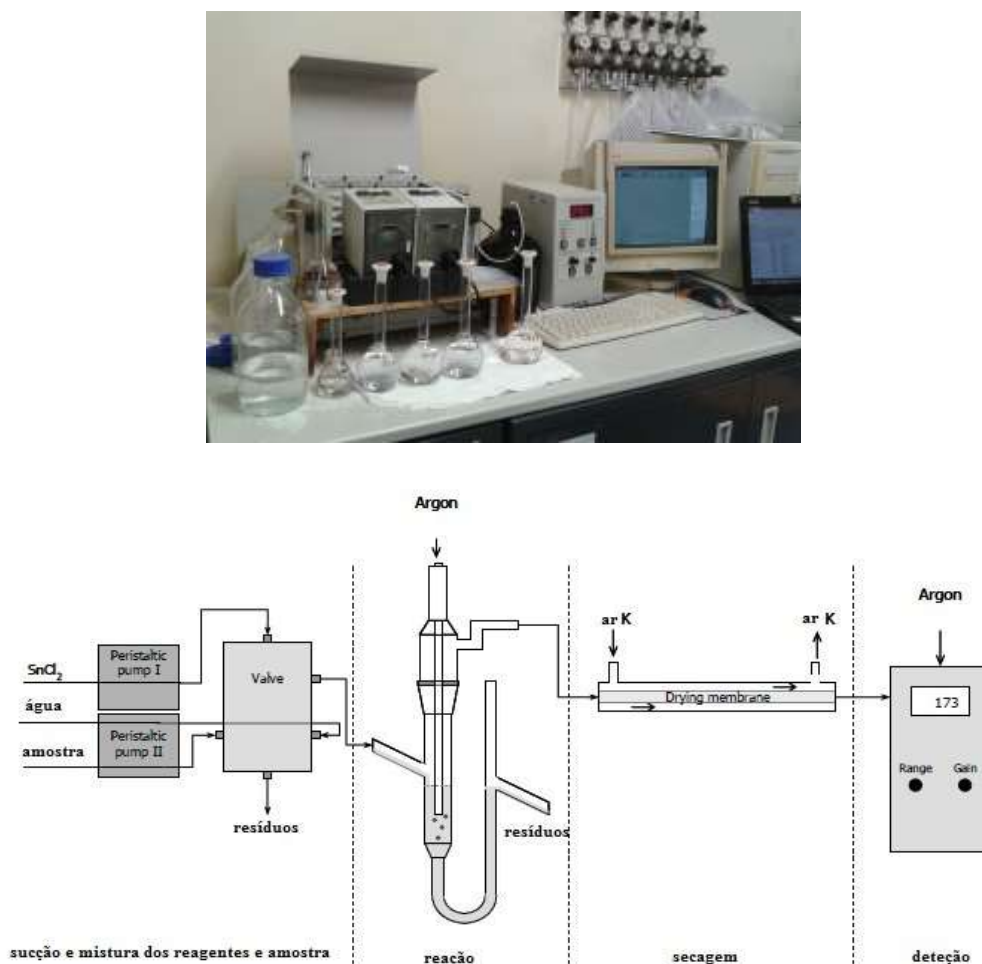
### **1.7.1. Espectroscopia de fluorescência atômica de vapor frio**

O mercúrio é considerado um bom elemento para ser quantificado por fluorescência atômica, uma vez que apresenta pressão de vapor adequada (0,266 Pa a 298 K), o que permite que o vapor seja medido à temperatura ambiente, não necessitando de um fonte para gerar esse vapor. Os elétrons presentes nos átomos de mercúrio passam do estado fundamental para o estado excitado, quando expostos a uma radiação com o comprimento

de onda de 253,7 nm e voltam ao estado fundamental a esse mesmo comprimento de onda (fluorescência ressonante) (Harris, 2008; Sychra et al., 1975). Contrariamente à radiação de excitação, a fluorescência é omnidirecional e pode, por isso, ser detetada usando um fotomultiplicador ou fotodiodo UV.

Quando a energia da radiação de excitação é superior à energia da fluorescência, os eletrões podem ficar excitados eletrónica e vibracionalmente. Desta forma, após o processo de absorção há um relaxamento vibracional através de processos não radiativos para o seu estado vibracional fundamental e só depois se dá o decaimento radiativo (fluorescência) (Atkins e de Paula, 2006).

A Figura 2 ilustra o equipamento de fluorescência atómica com vapor frio utilizado para a quantificação de mercúrio na Universidade de Aveiro, juntamente com um diagrama que representa esquematicamente o processo de quantificação de mercúrio por esta técnica, desde a sucção dos reagentes até ao detetor, que se encontra ligado a um computador com *software* apropriado.



**Figura 2** – Esquema da técnica de fluorescência atómica de vapor frio para a quantificação de mercúrio e respetivo equipamento utilizado na Universidade de Aveiro.

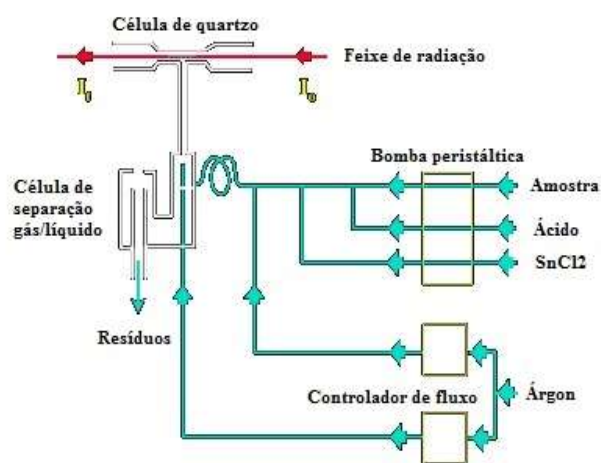
A amostra, o branco (normalmente água ultrapura) e o agente redutor ( $\text{SnCl}_2$ ) são retirados dos recipientes nas proporções requeridas pela reação química, através de bombas peristálticas, em direção à célula de mistura, programada para direcionar alternadamente o branco ou a amostra. A reação de redução ocorre na célula de mistura onde o agente redutor em meio ácido reage com a amostra, reduzindo o  $\text{Hg}^{2+}$  em solução a mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ), de acordo com a seguinte reação (Equação 2):



Os produtos resultantes são bombeados para uma célula de separação gás-líquido, onde o gás de arraste (árgon) é borbulhado, promovendo a passagem do  $\text{Hg}^0$  dissolvido na solução para a corrente gasosa. Antes de entrar no detetor, a corrente gasosa atravessa uma membrana de secagem, onde circula ar K, para remover o vapor de água, pois este pode originar fenómenos de *quenching* (Sanchez-Rodas et al., 2010; Sychra et al., 1975) (Figura 2). Finalmente, o vapor de mercúrio chega ao detetor para ser quantificado.

### 1.7.2. Espectroscopia de absorção atômica de vapor frio

Outra forma de interação da radiação eletromagnética com a matéria é a absorção (Sperling e Welz, 1999). Na Figura 3, é representado um esquema simplificado da técnica de espectroscopia de absorção atômica, e respetivo equipamento usado na Luságua para a quantificação de mercúrio.



**Figura 3** – Esquema da técnica de absorção atômica de vapor frio para a quantificação de mercúrio e respetivo equipamento utilizado na Luságua.

À semelhança da técnica de fluorescência atômica de vapor frio, a atomização do mercúrio ocorre quando o  $\text{Hg}^{2+}$  é reduzido a  $\text{Hg}^0$  por reação com o cloreto estânico ( $\text{SnCl}_2$ ), em meio ácido (Equação 2). O  $\text{Hg}^0$  é removido da solução pelo borbulhar do gás árgon. O vapor de mercúrio é transportado pelo árgon até a uma célula de quartzo, colocada no percurso ótico do espectrofotômetro, medindo-se em contínuo a absorvância da radiação de comprimento de onda 253.7 nm, emitida por uma lâmpada de vapor de mercúrio. De modo a evitar a condensação de gotas de vapor de água na célula, que são arrastadas da solução com o vapor de mercúrio, a célula é mantida quente durante todo o processo de determinação do elemento.

Quando se usa o método com pré-concentração do vapor de mercúrio em fio de ouro, existe um tubo de quartzo que contém um fio de platina revestido electroliticamente de ouro, que é envolvido por uma resistência elétrica. Este tubo é colocado entre o frasco de reação e a célula de absorção atômica. O mercúrio gerado durante a reação de redução é transportado pela corrente de árgon até ao fio de ouro, onde é quantitativamente amalgamado. Posteriormente, o fio é aquecido, sendo o mercúrio libertado e transportado pelo gás de arraste até à célula de absorção. Para arrefecer rapidamente o fio e prosseguir com uma nova pré-concentração de outra amostra, faz-se passar uma corrente de ar durante alguns segundos. Este método de determinação é mais sensível, obtendo-se um limite de deteção cerca de dez vezes inferior ao da técnica sem amalgamação (Leopold et al., 2010).

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Materiais, reagentes e equipamentos

Para a realização do trabalho experimental recorreu-se a reagentes obtidos diretamente de fornecedores comerciais e sem se proceder a qualquer modificação adicional. Na Tabela 7 apresenta-se a lista de materiais, reagentes e equipamentos utilizados.

**Tabela 7** – Lista de material, reagentes e equipamentos usados na Luságua e na Universidade de Aveiro.

Material	Fornecedor	Aplicação
Universidade de Aveiro		
Ácido nítrico 65%	Merck	Preparação de padrões
Ácido Clorídrico 37%	Merck	Análise de mercúrio
Cloreto de Estanho (II) desidratado	Merck	Análise de mercúrio
Solução padrão de Mercúrio 1000 mg/L	Merck	Preparação de padrões
Laboratório Luságua		
Ácido Clorídrico 37%	Fisher Chemical	Análise de mercúrio
Ácido nítrico 69%	Fluka Chemical	Preparação de padrões
Cloreto de Estanho (II) desidratado	Fisher Chemical	Análise de mercúrio
Solução padrão de Mercúrio 1000 mg/L	Merck	Preparação de padrões
Ácido nítrico 65%	Carlo ERBA reagents	Acidificação das amostras
Permanganato de potássio 99%	Merck	Análise de mercúrio
Dicromato de potássio 99%	Merck	Preservação das amostras

<b>Equipamento</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Universidade de Aveiro		
<b>Espectrofotómetro de fluorescência atómica de vapor frio</b>		
Gerador vapor frio		
Detetor de Fluorescência Atómica	PSA	10,003 Merlin 10,023
	PSA	
Balança analítica	Gibertini	E425
Destilador de água	GFL	2001/4
Sistema água Ultrapura	Millipore	Mili-Q Plus 185
Placa de agitação magnética	Fisher Scientific	FB 15002
Micropipeta	Eppendorf	-
Rampa filtração	KNF Lab	Filtração de amostras
Filtros 0,45 µm	Millipore	Filtração de amostras
Laboratório Luságua		
<b>Espectrofotómetro de Absorção Atómica</b>	Varian	SpectrAA 220 Fast
Lâmpada de mercúrio		Sequencial
Gerador de vapor		SpectrAA Lamp Nº 56-101034-00 VGA 77
Balança Analítica	Mettler Toledo	AG204
Destilador de Água	Maxima	USF ELGA
Micropipeta	BrandTech Scientific	-

## 2.2. Lavagem do material

Todo o material utilizado no trabalho de laboratório foi submetido a um processo de lavagem, de modo a garantir que não ocorram contaminações na gama de concentrações de trabalho utilizada. A lavagem do material de vidro efetuou-se com água da torneira, água destilada e solução de ácido nítrico 25% (v/v) na Universidade de Aveiro, ou solução de ácido nítrico 10% (v/v) no Laboratório Luságua. A secagem de todo o material foi feita ao ar, protegido da deposição de poeiras.



## 2.3. Preparação das soluções-padrão

A partir de uma solução padrão de mercúrio de 1000 mg/L com certificado de lote preparou-se um padrão intermédio de 10 mg/L em meio acidificado, no início de cada semana de trabalho. A partir deste último padrão preparou-se diariamente um padrão de 100 µg/L. A preparação dos padrões para o traçado da curva de calibração realizou-se de acordo com o indicado nas Tabelas 8 e 9, para a gama de trabalho acordada na Luságua e para a gama utilizada na Universidade de Aveiro (UA), respetivamente.

**Tabela 8** – Concentração dos padrões de calibração a considerar na absorção atómica.

Padrões (µg/L)	Branco	0,3	0,6	1	2
Volume de solução padrão 100 µg/L (µL)	0	300	600	1000	2000
Matriz	HNO <sub>3</sub> , 10% (v/v)				
Volume final (mL)	100				

**Tabela 9** – Concentração dos padrões de calibração a considerar na fluorescência atómica.

Padrões (µg/L)	Branco	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Volume de solução padrão 100 µg/L (µL)	0	200	400	600	800	1000
Matriz	HNO <sub>3</sub> , 2% (v/v)					
Volume final (mL)	200					

A partir de uma solução padrão de mercúrio de 1000 mg/L com certificado de lote e de lote diferente do utilizado para a calibração, preparou-se o padrão intermédio de 10 mg/L e a partir deste, outro de 100 µg/L. Do padrão de 100 µg/L prepararam-se os padrões de controlo 0,3 e 1 µg/L, para a absorção atómica (Luságua) e 0,1 e 0,4 µg/L para a fluorescência atómica (UA). Do mesmo modo preparou-se um padrão intermédio de 0,8 µg/L para a validação da gama de trabalho utilizada na Luságua, e um padrão intermédio de 0,25 µg/L para a validação da gama de trabalho utilizada na Universidade de Aveiro.

## 2.4. Amostras: descrição e preparação

As amostras de água analisadas no decorrer do Estágio no Laboratório Luságua e paralelamente na Universidade de Aveiro eram provenientes do distrito de Aveiro e tinham diferentes origens:

1. Amostras provenientes da carteira de clientes do Laboratório Luságua (representadas pelas letras de A a S);
2. Amostras de água recolhidas na margem da Ria de Aveiro, nomeadamente no Esteiro de Estarreja (Figura 4) e estrada da Bestida, a sul (Figura 5) e a norte (Figura 6), tomando como referência o antigo cais de embarque da Bestida, antes da construção da ponte da Varela (cuja nomenclatura é: Esteiro; Bestida sul 1; Bestida sul 2; Bestida norte 1; Bestida norte 2)
3. Lixiviados de sedimentos recolhidos na Ria de Aveiro, nos locais mencionados anteriormente (cuja nomenclatura é: Esteiro L; Bestida sul 1 L; Bestida sul 2 L; Bestida norte 1 L; Bestida norte 2 L);
4. Amostras de água recolhidas em 3 poços particulares, na localidade de Póvoa de Baixo, a aproximadamente 1,5 Km do perímetro industrial de Estarreja (cuja nomenclatura é: Poço 1; Poço 2; Poço 3).
5. Amostras analisadas no dia-a-dia da Universidade de Aveiro (cuja nomenclatura é: UA#1 e UA#2).



**Figura 4** – Esteiro de Estarreja.

O Esteiro de Estarreja é um canal com cerca de 4500 m de comprimento e largura que varia entre os 10 a 30 m. O Esteiro de Estarreja foi durante décadas o recetor de uma parte dos esgotos domésticos de Estarreja e da maior parte das águas pluviais, bem como de efluentes industriais de algumas das unidades fabris do complexo industrial de

Estarreja (Pereira et al., 2009). Foi através do Esteiro de Estarreja que, entre 1950s e 1994, foi descarregado na Ria de Aveiro um efluente rico em mercúrio proveniente da indústria de produção de cloro e soda caustica (Pereira et al., 2009).



**Figura 5** – Estrada da Bestida sul.



**Figura 6** – Estrada da Bestida norte.

A Bestida é uma zona que embora afastada do Esteiro de Estarreja, se situa a montante da saída do canal de acesso ao Largo do Laranjo, onde desagua esse esteiro. A escolha deste local deveu-se à sua boa acessibilidade e teve como objetivo avaliar a presença ou não de mercúrio na água à saída do canal de acesso ao Largo do Laranjo, em tempos a zona mais contaminada da Ria com mercúrio (Nunes et al., 2007).

Imediatamente após a recolha, as amostras de água recolhidas no Esteiro de Estarreja, na Bestida, e nos poços, foram filtradas por membranas de porosidade  $0,45\ \mu\text{m}$  e o filtrado guardado em recipiente próprio.

No Laboratório Luságua, os frascos para a recolha de amostras destinadas à análise de mercúrio são de vidro e têm capacidade para 250 mL de amostra. Para a preservação, adiciona-se às amostras 3 mL de uma solução de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  4% (m/v) em  $\text{HNO}_3$  50% (v/v). Na véspera da análise, adicionam-se 2 a 3 gotas de  $\text{KMnO}_4$  5% (m/v) às amostras para

verificar se o permanganato adicionado é consumido pela matéria orgânica que possa estar presente nas amostras. Caso se verifique a presença de matéria orgânica a amostra volta à cor inicial. Quando há matéria orgânica presente nas amostras, o laboratório da Luságua executa o procedimento de digestão descrito no *Standard Methods for the examination of water and wastewater* e no método 245.7 da EPA [VIII].

Na Universidade de Aveiro, as amostras destinadas à análise de mercúrio são armazenadas em frascos de vidro Schott (25-250 mL). As amostras são acidificadas com HNO<sub>3</sub> concentrado para valores de pH inferiores a 2. A quantificação do mercúrio total é feita após a oxidação da amostra (50 mL) com uma solução saturada de persulfato de potássio (500 µL) e irradiação UV durante 30 minutos. Imediatamente antes da análise, adicionam-se 37,5 µL de uma solução de hidroxilamina 12% (m/v), de modo a neutralizar o excesso de oxidante.

Os sedimentos recolhidas na Ria de Aveiro foram colocados em sacos de plástico e levados para o laboratório, onde se procedeu à sua lavagem com água da torneira, recolhendo-se o lixiviado resultante de três lavagens, para frascos de amostragem para posterior análise. Cada amostra de água de lixiviado da Ria de Aveiro, assim como a cada amostra colhida nos poços particulares, foi acidificada com 500 µL de HNO<sub>3</sub> 65% (v/v).

Das amostras que chegaram ao Laboratório Luságua provenientes dos clientes, nenhuma apresentava matéria orgânica, pelo que não houve a necessidade de se proceder à sua digestão.

Simultaneamente com as amostras foram sempre analisados brancos, preservados da mesma forma que as amostras.

## **2.5. Controlo de qualidade dos resultados**

O Laboratório Luságua sendo uma entidade acreditada, estabelece um procedimento de controlo de qualidade a cumprir no dia-a-dia. A qualidade analítica verifica-se através da leitura de um branco de 20 em 20 amostras ou por sessão de trabalho, dois padrões de controlo (padrão de menor e maior concentração) de 10 em 10 amostras, efetua-se ainda a análise de um duplicado de 20 em 20 amostras ou por sessão de trabalho e um ensaio de recuperação, com critério de aceitação de 80-120%.

O controlo de qualidade externo é realizado no Laboratório Luságua através da participação em ensaios interlaboratoriais da RELACRE – Associação de Laboratórios

Acreditados de Portugal. A Luságua integrou a lista de laboratórios que participou no ensaio interlaboratorial de Setembro de 2012, fazendo parte de uma lista com 65 participantes. Para o mercúrio, o resultado dessa última participação em ensaios interlaboratoriais foi um valor de Z-score, 0,5, que se encontra dentro do limite satisfatório, e um erro normalizado de 0,2, que por sua vez se encontra dentro dos limites de satisfação. Na Luságua estes ensaios estão a ser feitos de 2 em 2 anos.

Na Universidade de Aveiro, a qualidade analítica verifica-se através da leitura de brancos e de dois padrões de 3 em 3 amostras, por cada sessão de trabalho e de um ensaio de recuperação, com critério de aceitação de 80-120%.

## 2.6. Condições de operação dos equipamentos

As condições de operação dos equipamentos utilizados na Universidade de Aveiro (espectrofotómetro de fluorescência atómica de vapor frio) e no Laboratório Luságua (espectrofotómetro de absorção atómica de vapor frio) estão descritos nas Tabelas 10 e 11, respetivamente.

**Tabela 10** – Condições de operação do equipamento de fluorescência atómica.

Nomenclatura	Condições	Caudal
<b>Amostra</b>	Hg <sup>2+</sup> em HNO <sub>3</sub> 2% (m/v)	6,8 - 7,2 mL/min
<b>Branco</b>	Água Ultrapura	6,8 - 7,2 mL/min
<b>Agente redutor</b>	SnCl <sub>2</sub> , 2% (m/v) em HCl 10% (v/v)	3,2 – 3,6 mL/min
<b>Gás de arraste</b>	Árgon	250 mL/min
<b>Gás de secagem</b>	Ar K	2500 mL/min
<b>Tempo de pré-leitura</b>	10 s	
<b>Tempo de medição</b>	30 s	

**Tabela 11** – Condições de operação do equipamento de absorção atômica.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Condições</b>	<b>Caudal</b>
<b>Amostra</b>	Hg <sup>2+</sup> em HNO <sub>3</sub> 10% (m/v)	6,0-7,0 mL/min
<b>Branco</b>	HNO <sub>3</sub> 10% (v/v) em HCl 10% (v/v)	1,0-1,2 mL/min
<b>Agente redutor</b>	SnCl <sub>2</sub> 1% (m/v)	1,0-1,2 mL/min
<b>Gás de arraste</b>	Árgon – pureza 6,0 (≥ 99,9999%)	-
<b>Corrente da lâmpada</b>	4,0 mA	
<b>Largura de fenda</b>	1,0 nm	
<b>Tempo de medição</b>	1,2 s	
<b>Tempo pré-leitura</b>	60 s	

## 3. Apresentação e discussão de resultados

### 3.1. Procedimento de validação dos métodos de quantificação de mercúrio usados no Estágio

O principal objetivo deste trabalho consistiu em tentar diminuir o limite de quantificação do método analítico (CV-AAS) adotado pelo Laboratório Luságua, para a quantificação de mercúrio em águas de consumo. Sempre que um método é modificado, fica inerente a necessidade da sua validação e assim, um outro objetivo deste trabalho foi proceder à validação deste novo método. Procedeu-se igualmente à validação do método de análise de mercúrio em águas utilizado na Universidade de Aveiro (CV-AFS) para uma gama de trabalho semelhante, com o objetivo de avaliar a mais-valia da fluorescência atômica.

Cada laboratório deve ser capaz de exprimir resultados de ensaios e análises de uma forma consistente e credível, dada a necessidade cada vez maior de obter dados analíticos comparáveis, que não apresentem qualquer dúvida no que diz respeito à sua exatidão e que possuam uma precisão adequada para a finalidade a que se destinam. Para que se obtenham resultados analíticos confiáveis é necessário proceder-se à validação dos métodos analíticos. É fundamental que os laboratórios disponham de critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados satisfatórios (Guia RELACRE nº3, 1996; Guia RELACRE nº7, 1996; Guia RELACRE nº13, 2000).

A Luságua, como laboratório acreditado, tem uma ficha de validação onde é descrito todo o procedimento necessário para que um método seja validado. O laboratório

do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, não sendo um laboratório acreditado não possui nenhum procedimento de validação pelo que a abordagem seguida na validação do método na Universidade foi igual à do Laboratório Luságua.

Antes de realizar a validação de qualquer método analítico deve, antes de mais, ter-se em conta os seguintes aspetos: definir o técnico responsável pela execução dos ensaios que levarão à validação; reunir toda a informação bibliográfica aplicável ao método que se pretende validar e aos processos de validação disponíveis; definir, por escrito, o método, assim como condições de calibração dos aparelhos relacionados; definir os parâmetros que se devem calcular na validação, em função de normas, documentos legais e tipos de técnicas.

Para demonstrar a validade de um determinado método deve proceder-se à realização dos seguintes estudos: especificidade/seletividade; limite de quantificação; gama ou intervalo de trabalho e linearidade (para curvas de calibração); precisão (intermédia e repetibilidade); exatidão; sensibilidade (para curvas de calibração).

## **3.2. Validação do método de quantificação de mercúrio por absorção atómica no Laboratório Luságua**

### **3.2.1. Avaliação indireta**

#### **Gama de concentrações de trabalho**

Considera-se que a gama de concentrações de trabalho corresponde aos limites da curva de calibração, e a sua validade é demonstrada pela variação da homogeneidade de variância. Este estudo efetua-se através da análise de dez padrões independentes em cada extremo da curva de calibração, calculando a variância em cada extremo e efetuando o teste estatístico  $F$ . A gama de trabalho considera-se ajustada se a diferença de variâncias relativas aos dois padrões não for significativa (Guia RELACRE nº 13, 2000), isto é, se o valor de  $PG$  definido pela Equação 3, for igual ou inferior ao valor de  $F$  de Fisher para  $n-1$  graus de liberdade.

$$PG = \frac{s_{0,3}^2}{s_2^2} \qquad \text{Equação 3}$$



Considera-se  $S_{0,3}^2$  a variância associada ao padrão de 0,3 µg/L e  $S_2^2$  a variância associada ao padrão de 2 µg/L.

Para verificar se a gama adotada para este método está ajustada, efetuaram-se dez leituras de sinal para o primeiro e para o último padrão da gama de trabalho, em diferentes dias. Na Tabela 12 estão os valores dos parâmetros estatísticos calculados no dia 1 – Março de 2014. Na Tabela 13 apresenta-se apenas o valor de PG e o valor de  $F$  de Fisher para os resultados obtidos nos dias 2 e 3.

**Tabela 12** – Medições do padrão de 0,3 µg/L e 2 µg/L para o teste da homogeneidade de variâncias (Dia 1- Março de 2014).

<i>Padrões</i>	<i>0,3 µg/L</i>	<i>2 µg/L</i>
Sinal	0,0013	0,0084
	0,0012	0,0082
	0,0013	0,0084
	0,0015	0,0082
	0,0013	0,0083
	0,0015	0,0083
	0,0011	0,0082
	0,0014	0,0084
	0,0014	0,0083
	0,0011	0,0080
Média	0,0013	0,0083
Variância	2,1E-08	1,57E-08
Observações	10	
Graus de liberdade	9	
PG	<b>1,34</b> < 3,18	

**Tabela 13** – Resultados do teste de homogeneidade de variâncias para o dia 2 – Abril de 2014 e para o dia 3 – Maio de 2014

<b>Dia 2 – Abril de 2014</b>	
PG	<b>2,07</b> < 3,18
<b>Dia 3 – Maio de 2014</b>	
PG	<b>2,79</b> < 3,18

Os resultados do teste de homogeneidade de variâncias indicam que o valor de PG foi sempre inferior ao valor de  $F$  crítico ao longo de todo o teste, efetuado em três dias

diferentes. Este teste estatístico permite concluir que a diferença entre as variâncias não é significativa e consequentemente que a gama de trabalho adotada está ajustada.

### Curva de calibração

Em análises quantitativas, a calibração é um processo pelo qual a resposta do equipamento se relaciona com uma concentração conhecida. No método dos mínimos quadrados, o eixo das ordenadas representa a resposta instrumental, e o eixo das abcissas representa as concentrações dos padrões (Guia RELACRE nº13, 2000). Ao longo do Estágio foram efetuadas diversas curvas de calibração, cujos resultados vão sendo comentados ao longo do texto. No entanto, para exemplificar o processo de validação irei apenas usar uma curva de calibração, selecionada arbitrariamente. As absorvâncias obtidas para cada padrão de calibração da gama escolhida, assim como a respetiva média, desvio padrão, intervalos de confiança (IC) e coeficientes de variação (CV), obtidos pela Equação 4, apresentam-se na Tabela 14.

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

**Tabela 14** – Média das intensidades obtidas para os padrões de calibração de Hg em CV-AAS (Abril de 2014).

<b>Padrões (µg/L)</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Média das absorvâncias</b>	0,0023	0,0045	0,0081	0,017
<b>Desvio padrão</b>	1,47E-04	1,41E-04	2,32E-04	1,03E-04
<b>IC (95%)</b>	3,11E-04	2,64E-04	2,68E-04	5,17E-04
<b>CV (%)</b>	6,4	3,1	2,9	0,6

Os valores de absorvância obtidos para a gama de padrões utilizados, permite verificar que é possível diminuir o limite de quantificação de 0,4 µg/L para 0,3 µg/L, dado que a média das intensidades obtida para o menor padrão é vinte vezes superior à média das intensidades obtida na leitura do branco (0,0001). Como se pode observar na Tabela 14 e na Tabela 21, onde são descritos os resultados obtidos ao longo de vários dias de trabalho, os coeficientes de variação para os padrões nunca foram superiores a 10%.

Antes de se efetuar a curva de calibração aplicou-se o Teste *t* com o objetivo de verificar se os pontos pertenciam à curva de calibração. Na Tabela 15 é apresentado o Teste *t* e respetiva decisão.

**Tabela 15** – Teste  $t$  (teste de hipóteses) para a decisão de pontos pertencentes à curva de calibração (Abril de 2014).

Conc. (µg/L)	Y <sub>médio</sub>	Y <sub>estimado</sub>	Desvio padrão	Teste t	Decisão
0	0,0001	0,0001	0,0001	0,97	O ponto pertence à reta
0,3	0,0023	0,0023	0,0001	0,10	O ponto pertence à reta
0,6	0,0045	0,0047	0,0001	-3,7	O ponto pertence à reta
1	0,0081	0,0080	0,0002	1,5	O ponto pertence à reta
2	0,017	0,017	0,0001	-0,43	O ponto pertence à reta

Os resultados do Teste  $t$  permitem constatar que todos os pontos pertencem à curva de calibração, pois todos os valores de  $t_{calculado}$  são inferiores ao valor do  $t_{tabelado}$  (2,57), para  $n-1$  leituras efetuadas com um intervalo de confiança de 95%. Ao longo do trabalho, houve uma curva de calibração que apresentou dois pontos não pertencentes à curva e uma outra, apenas um ponto. No primeiro caso, a curva foi rejeitada e procedeu-se a uma nova calibração, enquanto no segundo caso prosseguiu-se com a calibração, eliminado esse ponto.

A linearidade de uma reta de calibração pode ser avaliada pela determinação do valor PG, calculado pelas Equações 5 e 6, comparando-o com o valor de  $F$  tabelado (Guia RELACRE nº13, 2000). Se o valor PG for inferior ao valor de  $F$  tabelado verifica-se que o método tem capacidade para gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito em toda a gama de padrões (Guia RELACRE nº13, 2000).

$$DS^2 = (N - 2) \times S^2_{y/x} - (N - 3) \times S^2_{y2} \quad \text{Equação 5}$$

$$PG = \frac{DS^2}{S^2_{y2}} \quad \text{Equação 6}$$

Considera-se  $DS^2$  a diferença das variâncias,  $S_{y/x}$  o desvio padrão residual obtido pela análise de variância,  $S_{y2}$  a soma dos quadrados dos resíduos e  $N$ , o número de padrões de calibração, neste caso 5 (Guia RELACRE nº13, 2000).

A Tabela 16 apresenta os valores do teste, onde se mostra que a função de calibração é não linear para a análise de mercúrio por absorção atômica de vapor frio.

**Tabela 16** – Teste  $F$  para verificar a linearidade da curva de calibração.

PG=	2,42E+06
F=	6,39
PG $\geq$ F	

Assim sendo, estudou-se qual o modelo matemático que descreve a gama de trabalho com melhor ajuste. Através da ferramenta Excel, efetuou-se uma análise de variância, considerando os modelos, linear, quadrático e cúbico, cujos resultados são apresentados nas Tabela 17.

**Tabela 17** – Coeficientes de correlação para os modelos linear, quadrático e cúbico.

	Linear	Quadrático	Cúbico
Quadrado de R	0,9977	0,9998	0,9999
Quadrado de R ajustado	0,9969	0,9996	0,9996

Supõe-se que a procura do melhor modelo matemático termine quando o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) deixe de aumentar, aproximando-se o mais possível de 1. No entanto, sempre que se adiciona um parâmetro à equação polinomial, o  $R^2$  aumenta. Assim sendo, deve-se considerar o valor ajustado de  $R^2$  ( $R'^2$ ), que é calculado através dos quadrados médios em vez da soma dos quadrados, como exemplificado na Equação 7:

$$R'^2 = 1 - \left( \frac{\text{quadrados médios residuais}}{\text{quadrados médios totais}} \right) \quad \text{Equação 7}$$

Com esta abordagem tem-se em conta que o número de graus de liberdade dos resíduos na equação polinomial ( $n-k-1$ , em que  $k$  é o número de parâmetros na equação) se altera consoante o grau da equação (Miller e Miller, 2010).

Na Tabela 17 pode-se verificar que o modelo quadrático e o cúbico apresentam o maior valor de  $R'^2$ , indicando que 99.96% da variação total da absorvância é atribuída às variáveis independentes, e que 0,04% dessa variância não pode ser explicada pelo modelo (Miller e Miller, 2010). Nos restantes estudos efetuados observou-se também que os valores de  $R'^2$  são superiores quando se faz a análise em modelo quadrático e em modelo cúbico.

Na Tabela 18 são apresentados os valores de concentração correspondentes a determinados valores de absorvância, a partir dos dados da Tabela 14, recorrendo aos modelos linear, quadrático e cúbico.

**Tabela 18** – Valores de concentração correspondentes a determinados valores de absorvância obtidos pelos modelos linear, quadrático e cúbico.

	<b>Linear</b>	<b>Quadrática</b>	<b>Cúbica</b>
Y=0,0023	0,30	0,30	0,31
Y=0,0045	0,56	0,58	0,59
Y=0,0081	0,97	1,01	1,0
Y=0,017	2,0	1,1	1,1

Verifica-se que os resultados obtidos através de um modelo quadrático e cúbico são semelhantes e diferem dos obtidos para o modelo linear. Esta tendência foi observada em diferentes dias de análise, pelo que o modelo escolhido para fazer a calibração foi o modelo quadrático e excluiu-se a utilização do modelo linear.

A curva de calibração associado ao exemplo da Tabela 14 é dada por:

$$Y = 6,632E - 04x^2 + 7,252E - 03x + 6,040E - 05 \quad \text{Equação 8}$$

A sensibilidade do método avalia a capacidade de um método ou equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentrações de um analito. Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa reta (Guia RELACRE nº3, 1996; Guia RELACRE nº13, 2000).

Tratando-se de uma equação quadrática, a sensibilidade não é constante ao longo de toda a gama de trabalho, e é definida pela derivada de primeira ordem da curva de calibração em cada ponto (Guia RELACRE nº13, 2000). Os valores apresentados na Tabela 19 foram obtidos a partir da equação 9.

$$E = 2 \times 6,632E - 04x + 7,252E - 03 \quad \text{Equação 9}$$

**Tabela 19** – Sensibilidade associada a cada valor de concentração da curva de calibração e respectivo intervalo de confiança (Abril de 2014).

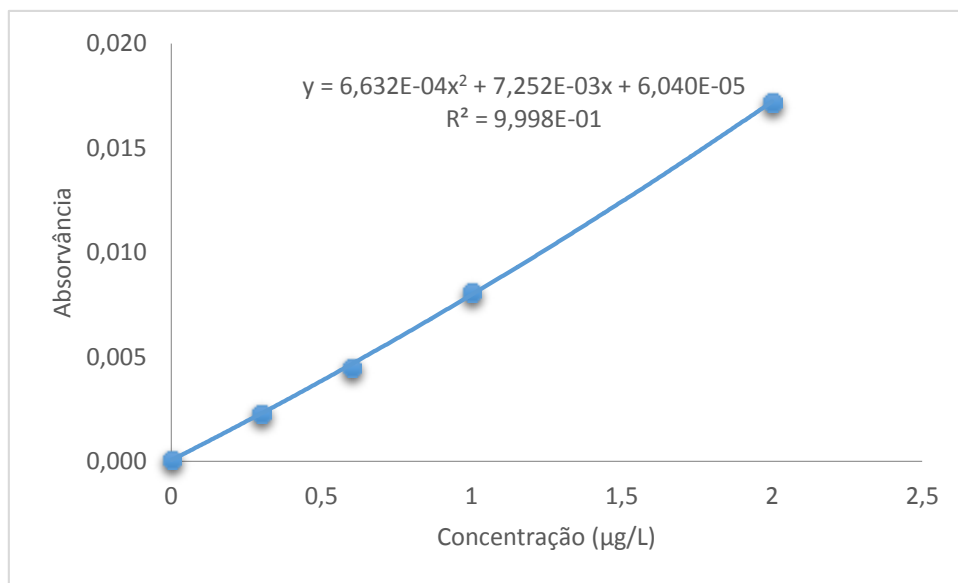
Conc. (µg/L)	Sensibilidade	IC (95%)
0	7,252E-03	4,057E-04
0,3	7,650E-03	
0,6	8,048E-03	
1	8,579E-03	
2	9,905E-03	

Os cálculos dos intervalos de confiança foram feitos através da ferramenta Matlab. O intervalo de confiança relativa à ordenada na origem foi obtido pela matriz de covariância, obtida a partir da variância residual, para  $t=4,3$  (95%; Gl=2). O intervalo de confiança relativo à sensibilidade foi obtido somando as variâncias correspondentes a cada termo da Equação 9, para  $t=4,3$ . Dado que a sensibilidade para cada padrão tem todos a mesma ordem de grandeza, o intervalo de confiança foi igual.

Na Tabela 20 são apresentados os parâmetros da curva de calibração, que por sua vez é apresentada na Figura 7.

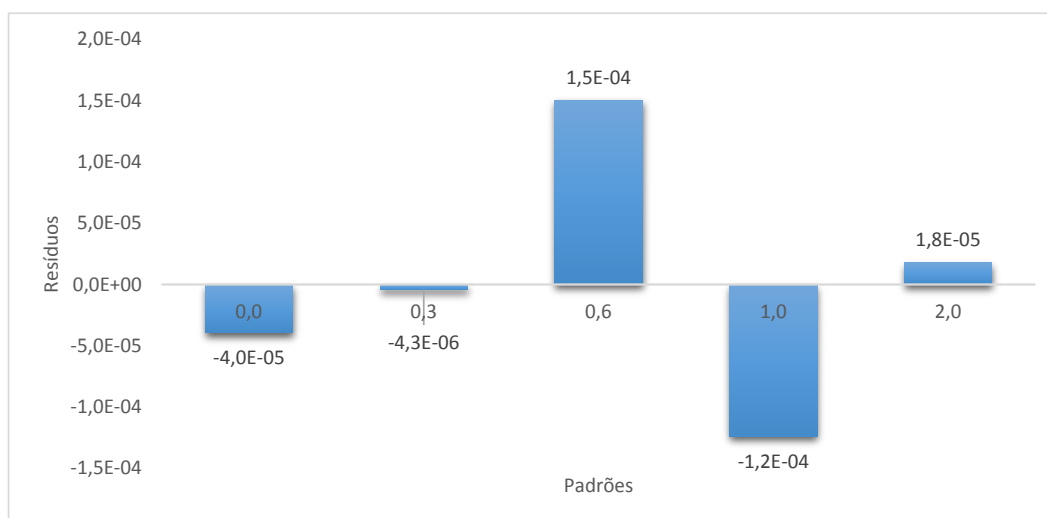
**Tabela 20** – Parâmetros da curva de calibração a análise de Hg em CV-AAS (Abril 2014).

Parâmetro	Valor
Ordenada na origem (a)	$6,04E-05 \pm 6,67E-06$
$R^2$	0,9998 > <b>0,995</b>
$S_{y/x}$	1,79E-04
$S_{y2}$	3,99E-08
$S_a$ (desvio padrão da ordenada na origem)	1,25E-04
$S_{b1}$ (desvio padrão para a Variável X)	3,31E-04
$S_{b2}$ (desvio padrão para a Variável $X^2$ )	1,53E-04



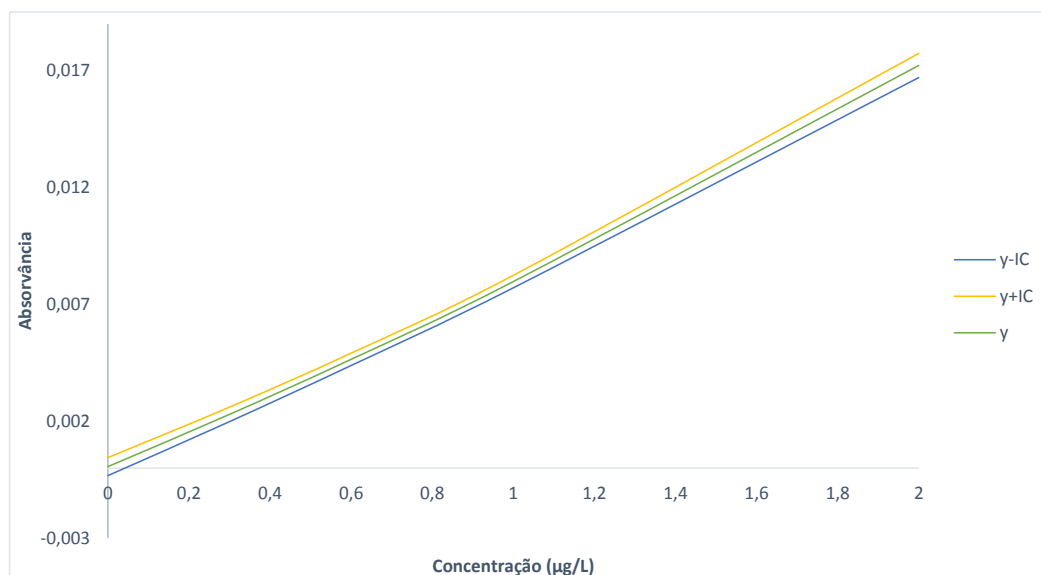
**Figura 7** – Curva de calibração para a análise de Hg em CV-AAS (Abril 2014).

Como se pode verificar na Tabela 20, o valor do coeficiente de correlação é superior a 0,995 (valor estipulado pela RELACRE e aceite pela Luságua), pelo que se considera que esta curva apresenta boa correlação da absorvância em função da concentração (Guia RELACRE nº3, 1996; Guia RELACRE nº13, 2000). Para comprovar isto, analisou-se a representação gráfica dos valores dos resíduos para cada um dos padrões da curva de calibração (Figura 8). A análise revela que não há nenhum padrão de variação definido, ou seja, o erro não é sistematicamente superior ou inferior. A ausência de um padrão de variação definido foi também observada para as restantes curvas de calibração.



**Figura 8** – Valor dos resíduos para cada um dos padrões da curva de calibração (Abril 2014).

A Figura 9 apresenta os intervalos de confiança associados à concentração dos padrões ao longo da curva de calibração.



**Figura 9** – Curvas associadas ao intervalo de confiança para os padrões de Hg em CV-AAS (Abril 2014).

Verifica-se que os intervalos de confiança são pequenos, levando a concluir que os resultados são confiáveis.

Na Tabela 21, estão resumidos os parâmetros das curvas de calibração obtidas por CV-AAS durante o Estágio.

Uma vez que as sensibilidades para cada padrão de calibração são idênticas, os valores de  $E$  ( $\text{sensibilidade}_m$ ) para cada curva de calibração foram calculados usando o valor de concentração médio dos padrões de calibração, ou seja,  $0,975 \mu\text{g/L}$ .



**Tabela 21** – Parâmetros das curvas de calibração usadas para a determinação de Hg por CV-AAS.

<i>Data (Ano 2014)</i>	<i>E (x=0,975 µg/L) (Sensibilidade<sub>m</sub>)</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>Ordenada na origem</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>CV<sub>m</sub> (%)</i>
Fevereiro 1	8,87E-03	2,27E-04	-6,10E-04	6,65E-05	0,9991	5,3
Fevereiro 2	5,38E-03	9,65E-05	7,00E-05	1,08E-05	0,9994	2,1
Fevereiro 3	4,72E-03	4,97E-06	-3,80E-04	1,40E-06	0,9999	5,1
Março 1	4,77E-03	1,78E-04	4,50E-04	4,87E-05	0,9978	3,6
Março 2	3,98E-03	1,27E-04	-1,00E-04	1,87E-05	0,9977	2,8
Março 3	4,18E-03	1,21E-04	-1,90E-04	2,22E-05	0,9977	6,7
Março 4	4,63E-03	2,95E-05	-1,70E-04	5,66E-06	0,9999	5,8
Março 5	4,22E-03	4,59E-05	-1,89E-05	3,33E-06	0,9997	7,0
Março 6	4,09E-03	1,05E-04	-1,00E-04	1,82E-05	0,9985	4,5
Março 7	6,83E-03	1,24E-04	-2,40E-04	3,05E-05	0,9993	6,3
Abril 1	1,10E-02	1,99E-04	-4,50E-04	3,82E-05	0,9996	3,9
Abril 2	6,12E-03	2,15E-04	-3,80E-04	5,16E-05	0,9983	5,5
Abril 3	6,98E-03	2,62E-04	-4,90E-04	5,94E-05	0,9981	3,8
Abril 4	1,01E-02	1,24E-04	-1,80E-04	1,70E-05	0,9998	5,1
Abril 5	5,66E-03	1,77E-04	1,80E-04	2,79E-05	0,9984	4,8
Abril 6	7,93E-03	9,93E-05	-3,00E-05	4,86E-06	0,9998	2,7
Abril 7	5,47E-03	2,79E-05	4,00E-05	2,16E-05	0,9974	2,5
Abril 8	9,86E-03	1,79E-04	-5,00E-05	5,58E-06	0,9996	2,3
Abril 9	9,05E-03	7,20E-05	3,50E-04	1,73E-05	0,9999	1,4
Abril 10	8,55E-03	7,32E-05	6,00E-05	6,68E-06	0,9999	3,2
Maió 1	1,09E-02	1,67E-04	1,35E-03	5,81E-05	0,9997	3,0
Maió 2	1,07E-02	4,53E-04	-3,10E-04	6,75E-05	0,9984	2,9
Maió 3	1,04E-02	3,39E-05	6,60E-04	8,37E-06	1,0000	1,8
Maió 4	1,03E-02	1,67E-04	2,70E-04	2,75E-05	0,9996	2,1
Maió 5	4,27E-03	1,51E-04	-1,90E-04	2,85E-05	0,9980	2,8
Junho 1	4,08E-03	1, 05E-04	-1,00E-04	1,82E-05	0,9985	4,5
Junho 2	5,66E-03	1,77E-04	1,80E-04	2,79E-05	0,9984	4,8
Junho 3	1,09E-02	1,67E-04	1,35E-03	5,81E-05	0,9997	3,0
Junho 4	3,98E-03	1,27E-04	-1,00E-04	1,87E-05	0,9977	2,8
Junho 5	9,40E-03	1,23E-04	-5,00E-05	1,07E-05	0,9998	3,2

• CV<sub>m</sub> – Coeficiente de variação médio; IC – Intervalo de confiança

Observa-se que os valores de R<sup>2</sup> variaram entre 0,997 e 1,00 comprovando que todas as curvas têm boa correlação da absorvância em função da concentração e que cumprem o critério estabelecido para o R<sup>2</sup>, sendo este maior do que 0,995. Como já referido anteriormente, os coeficientes de variação médios (CV<sub>m</sub>%) nunca ultrapassam os 10%, encontrando-se entre 1,4% e 7,0% (Tabela 21).

## Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma dada precisão e exatidão. O limite de quantificação (LQ) pode ser determinado tendo em consideração a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou usando um padrão com concentração igual ao menor valor da curva de calibração, ou um branco fortificado.

A atualização do limite de quantificação deverá ser efetuada sempre que ocorrem alterações de analista, reagentes, equipamento, ambiente, entre outros (Guia RELACRE nº3, 1996; Guia RELACRE nº13, 2000).

Neste caso, considera-se como limite de quantificação o padrão de menor valor da curva de calibração. A sua aceitação passa por analisar consecutivamente um padrão (10 vezes no mínimo), de concentração igual à do menor padrão da curva (neste caso o padrão de 0,3 µg/L), em condições de precisão intermédia ou repetibilidade, e estimar a média ( $\bar{X}_i$ ) e o desvio padrão ( $S_i$ ). Com os valores obtidos calculam-se os coeficientes de variação (pela Equação 4), o erro relativo médio (Equação 10) e os respetivos limites de repetibilidade (r):

$$\text{Erro relativo médio} = \frac{|\mu - \bar{X}_i|}{\mu} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Em que  $\mu$  é o valor esperado, e neste caso corresponde ao valor do menor padrão (0,3 µg/L). O limite de quantificação é aceite se o método cumprir o critério de 10% para o coeficiente de variação e para o erro relativo. Se este critério não for cumprido deve-se testar novo limite de quantificação.

Os resultados obtidos em dias diferentes (Dia 1 em Abril de 2014 e dia 2 em Maio de 2014) e por diferentes analistas (técnico do Laboratório Luságua e Estagiária) apresentam-se na Tabela 22.

**Tabela 22** – Leituras do padrão de 0,3 µg/L para validação do limite de quantificação.

Padrão 0,3 µg/L	Média	Desvio padrão	n	r	Erro relativo médio (%)	CV%
Analista 1/Dia 1	0,31	1,42E-02	10	3,16E-02	3	4,5
Analista 1/Dia 2	0,31	1,91E-02	10	4,32E-02	3	6,2
Analista 2/Dia 1	0,28	1,26E-02	10	2,86E-02	7	4,5
Analista 2/Dia 2	0,30	1,08E-02	10	2,44E-02	0	3,7

Estes cálculos foram efetuados após identificação de valores anómalos pelo Teste de Grubbs (teste não exemplificado nesta secção; a definição e exemplificação podem ser encontradas numa secção posterior). O valor do erro relativo e do coeficiente de variação para os diferentes dias e para os diferentes analistas foi sempre inferior a 10%, verificando-se que o método cumpriu sempre o critério estabelecido. Deste modo é possível estabelecer e aceitar o valor de 0,3 µg/L como o limite de quantificação do método.

### **Ensaio de recuperação**

A especificidade e a seletividade estão relacionadas com a capacidade de deteção. A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito, numa mistura, sem interferência dos outros componentes. A especificidade é a discriminação do analito relativamente a outras substâncias, ou seja, garantir que o resultado obtido provém apenas do analito. Assim, será necessário averiguar se existem interferências de outras eventuais substâncias na amostra. Para demonstrar a especificidade realizam-se testes de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, variando a concentração do analito em quantidades bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho.

O método analítico pode ser considerado aplicável (específico e seletivo), quando na prática e após a realização de testes de recuperação (cálculo da percentagem de recuperação), se verificar que a taxa de recuperação varia entre 80 e 120% (critério aceite pela Luságua). A percentagem de recuperação (*R*) obtém-se pela equação (Guia RELACRE nº3, 1996; [XII]; [IX]):

$$\%R = 100 \times \frac{[\text{analito}]_{\text{após adição}} - [\text{analito}]_{\text{antes da adição}}}{\text{Concentração adicionada}} \quad \text{Equação 11}$$

Qualquer valor obtido compreendido no intervalo mencionado fornece a informação de que, tanto o procedimento, quanto a matriz, não tem influência na deteção do analito, demonstrando que o método é capaz de identificar e quantificar todo o analito presente na amostra.

Neste tipo de ensaios calcula-se a percentagem de recuperação (Equação 11) e a exatidão (Equação 10). Os resultados dos ensaios de recuperação realizados durante este Estágio com concentração de *spike* variável são apresentados na Tabela 23.

**Tabela 23** – Ensaios de recuperação na análise de Hg por CV-AAS.

<i>Amostra</i>	<i>Data</i> (Ano de 2014)	<i>Camostra</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	<i>Cspike</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	<i>Camostra+spike</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	<i>Recuperação</i> (%)	<i>Exatidão</i> (%)
A	Março	0,035	1,0	1,10	107	6
B	Março	0,065	1,0	0,94	88	12
C	Abril	0,935	1,0	1,84	91	5
E	Abril	0,050	1,0	0,99	94	6
F	Abril	0,125	0,8	0,83	88	10
G	Abril	0,105	1,0	1,01	91	9
H	Abril	0,060	1,0	1,02	96	4
I	Maio	0,040	1,0	1,20	116	15
J	Maio	0,310	0,8	1,21	113	9
L	Maio	0,030	0,3	0,30	90	9
M	Maio	0,106	0,8	0,95	106	5
N	Maio	0,120	0,8	1,01	111	10
O	Maio	0,240	0,5	0,75	102	1
P	Maio	0,420	0,5	0,83	82	10
Q	Junho	0,150	0,5	0,68	106	5
R	Junho	0,480	0,8	1,21	91	5
S	Junho	0,620	1,0	1,56	94	4
Esteiro	Maio	0,730	0,3	1,07	113	4
Esteiro L	Maio	1,030	0,5	1,62	118	6
Bestida sul 1 L	Maio	0,310	0,8	1,20	111	8
Bestida sul 2 L	Maio	0,930	0,5	1,55	124	8
Bestida norte 2	Maio	0,300	1,0	1,42	112	9
UA #1	Junho	0,590	0,5	1,07	96	2

Do conjunto de ensaios de recuperação realizados, verificou-se que uma amostra apresentou uma percentagem de recuperação superior ao valor máximo do critério de aceitação do Laboratório Luságua - amostra Bestida sul 2 L com percentagem de recuperação de 124%, mas com erro sistemático de 8%. A amostra que apresenta maior erro sistemático, ou seja falta de exatidão, é a amostra I, encontrando-se muito próximo do valor limite. Estes resultados permitem concluir que nem o procedimento, nem a matriz tiveram influência na deteção e quantificação do analito.

### **Precisão (repetibilidade e precisão intermédia)**

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Geralmente, é mais realista e preferível estudar a precisão sobre amostras, para minimizar os efeitos de matriz.

A dispersão de resultados pode ser avaliada através da repetibilidade e da reprodutibilidade e/ou da precisão intermédia (Guia RELACRE nº3, 1996; Guia RELACRE nº13, 2000).

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, ensaio de amostras em duplicado. O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio obtidos nas condições acima referidas. A repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios efetuados no próprio laboratório. Para esse efeito, efetua-se uma série de medições ( $n \geq 10$ ), em cada nível de concentrações, sobre uma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Para cada nível de concentração, deve ser calculada a variância associada à repetibilidade do método de ensaio e o coeficiente de variação de repetibilidade, expresso pela Equação 4 (Miller e Miller, 2010). Para que o método apresente precisão aceitável, este valor deve ser sempre  $<10\%$ .

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método, efetuado em condições de ensaio diferentes, sobre uma mesma amostra, utilizando o mesmo método de ensaio, mas fazendo variar as condições de medição (diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos e/ou dias diferentes). O limite de reprodutibilidade ( $r$ ) é o valor abaixo do qual se deve situar com uma probabilidade específica (95%), a diferença absoluta entre dois ensaios ( $X_i$  e  $X_{i-1}$ ) obtidos nas condições referidas. Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se  $|X_i - X_{i-1}| \leq r$ . A reprodutibilidade de um método de análise é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais (Guia RELACRE nº3, 1996; Guia RELACRE nº7, 1996; Guia RELACRE nº13, 2000). Neste estágio não se fez o estudo da reprodutibilidade, pois o Laboratório Luságua só está a efetuar ensaios interlaboratoriais de dois em dois anos, como já referido anteriormente.

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em

laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes dias. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e como tal a mais aconselhável. Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições predefinidas. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo a gama de concentração de trabalho. Existem vários métodos para determinação e controlo desse parâmetro de qualidade, nomeadamente, cartas de controlo de amplitudes e cálculo do desvio padrão da precisão intermédia (Guia RELACRE nº3, 1996; Guia RELACRE nº13, 2000).

Para a avaliação da repetibilidade, foram analisados 4 padrões, tendo os valores sido testados para identificação de valores anómalos aplicando o Teste de Grubbs (Equação 12). Neste teste ordenam-se os resultados obtidos por ordem crescente e calcula-se a média e o desvio padrão, testando-se o menor e o maior valor:

$$G = \frac{\text{ValorSuspeito} - \text{média}}{\text{DesvioPadrão}} \quad \text{Equação 12}$$

Caso o teste indique a existência de um valor anómalo, retira-se esse valor e volta-se a fazer o teste, caso contrário pode-se calcular a repetibilidade. Nas Tabelas 24, 25, 29, 30 e 31 estão exemplificados alguns dos resultados obtidos pelo Teste de Grubbs, respetivamente, para o padrão de menor e maior concentração e realizados por analistas diferentes.

**Tabela 24** – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 2) em Abril de 2014, em dias consecutivos.

<i>Leitura</i>	<i>Conc. (µg/L)</i>	<i>Conc. ordenadas (µg/L)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>G</i>
1	0,33	0,29			-1,62
2	0,32	0,29			
3	0,29	0,31			
4	0,32	0,31			
5	0,33	0,31	0,31	0,01	
6	0,32	0,32			
7	0,31	0,32			
8	0,31	0,32			
9	0,29	0,33			
10	0,31	0,33			1,20

Nas Tabelas 26 e 27 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da repetibilidade do padrão de menor concentração, para os analista 2 e 1 (técnico do Laboratório Luságua e Estagiária). Os resultados obtidos no estudo da repetibilidade para os restantes padrões de trabalho estão apresentados nas Tabelas 32, 34 e 36. Com estes valores efetuou-se o Teste *F*, que permite avaliar a variabilidade devido a analistas diferentes nos resultados obtidos para os 4 padrões (Tabelas 28, 33, 35 e 37).

Neste conjunto de dados, obtidos pelo analista 2, verifica-se que não existem valores anómalos, pois tanto para a concentração mais baixa obtida (0,29 µg/L), como para a mais alta (0,33 µg/L), o valor de *G* determinado é menor que o valor de *G* tabelado (2,29) para n=10 (Miller e Miller, 2010).

**Tabela 25** – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1) em Maio de 2014, em dias consecutivos.

<i>Leitura</i>	<i>Conc. (µg/L)</i>	<i>Conc. ordenadas (µg/L)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>G</i>
1	0,30	0,28			-1,52
2	0,31	0,28			
3	0,33	0,30			
4	0,31	0,30			
5	0,28	0,31	0,31	0,02	
6	0,32	0,31			
7	0,33	0,32			
8	0,33	0,33			
9	0,3	0,33			
10	0,28	0,33			1,10

No conjunto de dados obtidos pelo analista 1, no estudo da repetibilidade do padrão de menor concentração, também não se observou a existência de valores anómalos, pois tanto o valor de *G* calculado para a concentração mais baixa como para a concentração mais alta, são menores que o *G* tabelado (2,29) para n=10 (Miller e Miller, 2010).

A ausência de valores anómalos para a repetibilidade nos conjuntos de dados obtidos pelos analistas 1 e 2, permite determinar a repetibilidade do padrão de menor concentração, para analistas diferentes. Este teste de repetibilidade foi feito três vezes para cada analista, tendo-se obtido resultados semelhantes.

**Tabela 26** – Repetibilidade do padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 2).

	<i>Conc.</i>	<i>Média</i>	<i>Desv pad</i>	<i>X<sub>i</sub>-X<sub>i-1</sub></i>	<i>r</i>	<i>Critério de aceitação</i>	<i>CV%</i>
Padrão 0,3 µg/L - Analista 2	0,33			0,01		Aceite	
	0,32			-0,03		Aceite	
	0,29			0,03		Aceite	
	0,32			0,01		Aceite	
	0,33	0,31	0,014	0,01	0,032	Aceite	4,5
	0,32			0,01		Aceite	
	0,31			0,00		Aceite	
	0,31			0,02		Aceite	
	0,29			0,02		Aceite	
	0,31						

No caso do ensaio conduzido pelo analista 2, verifica-se que todas amostras são aceites usando o critério anteriormente referido e que o valor do coeficiente de variação de repetibilidade é inferior a 10%.

**Tabela 27** – Repetibilidade do padrão de concentração 0,3 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1).

	<i>Conc.</i>	<i>Média</i>	<i>Desv pad</i>	<i>X<sub>i</sub>-X<sub>i-1</sub></i>	<i>r</i>	<i>Critério de aceitação</i>	<i>CV%</i>
Padrão 0,3 µg/L - Analista 1	0,30			0,01		Aceite	
	0,31			0,02		Aceite	
	0,33			0,02		Aceite	
	0,31			-0,03		Aceite	
	0,28	0,31	0,019	0,04	0,043	Aceite	6,2
	0,32			0,01		Aceite	
	0,33			0,00		Aceite	
	0,33			0,03		Aceite	
	0,3			-0,02		Aceite	
	0,28						

À semelhança do caso anterior, no ensaio realizado pelo analista 1, verifica-se que todas amostras são aceites usando critério estabelecido pela Luságua e que o valor de coeficiente de variação de repetibilidade é inferior a 10%.



**Tabela 28** – Teste  $F$  para testar diferenças entre as análises do padrão de 0,3 µg/L feitas por dois analistas.

	<i>Analista 2</i>	<i>Analista 1</i>
Variância	3,66E-04	2,01E-04
F	<b>1,82</b> < 3,18	

Com a realização do teste estatístico  $F$ , verifica-se não ser possível provar que haja diferenças significativas na precisão dos dois analistas, uma vez que o valor de  $F$  calculado (obtido pelo quociente entre as variâncias) é inferior ao valor de  $F$  tabelado.

Nas Tabelas 29, 30 e 31 é apresentado o Teste de Grubbs para o padrão de concentração 2 µg/L para ensaios realizados por analistas diferentes.

**Tabela 29** – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1) em Maio de 2014, em dias consecutivos.

<i>Leitura</i>	<i>Conc. (µg/L)</i>	<i>Conc. ordenadas (µg/L)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>G</i>
1	2,03	2,01			-0,78
2	2,05	2,01			
3	2,06	2,01			
4	2,03	2,03			
5	2,18	2,03	2,05	0,05	
6	2,06	2,05			
7	2,01	2,05			
8	2,01	2,06			
9	2,05	2,06			
10	2,01	<b>2,18</b>			2,61

Neste conjunto de dados obtidos pelo analista 1, verificou-se a presença de um valor anômalo (2,61>2,29), pelo que houve a necessidade de se considerar outro conjunto de valores (Tabela 30).

**Tabela 30** – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 1) em Maio de 2014, em dias consecutivos.

<i>Leitura</i>	<i>Conc. (µg/L)</i>	<i>Conc. ordenadas (µg/L)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>G</i>
1	2,05	2,01			-1,36
2	2,03	2,01			
3	2,06	2,03			
4	2,01	2,03			
5	2,05	2,03			
6	2,01	2,05	2,04	0,02	
7	2,03	2,05			
8	2,06	2,06			
9	2,08	2,06			
10	2,03	2,08			1,71

**Tabela 31** – Teste de Grubbs para o padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS (Analista 2) em Junho de 2014, em dias consecutivos.

<i>Leitura</i>	<i>Conc. (µg/L)</i>	<i>Conc. ordenadas (µg/L)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>G</i>
1	1,94	1,9			-1,61
2	1,99	1,91			
3	1,96	1,93			
4	1,93	1,94			
5	1,98	1,94			
6	1,98	1,96	1,95	0,03	
7	1,94	1,96			
8	1,91	1,98			
9	1,90	1,98			
10	1,96	1,99			1,35

Neste conjunto de resultados não existem valores anómalos, pelo que se prosseguiu com o estudo da repetibilidade, seguindo o mesmo processo utilizado para o padrão de 0,3 µg/L. Os resultados são apresentados na Tabela 32. Este teste de repetibilidade foi feito três vezes para cada analista, tendo-se obtido resultados semelhantes.

**Tabela 32** – Repetibilidade do padrão de concentração 2 µg/L de Hg em CV-AAS para os dois analistas.

	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>r</i>	<i>CV%</i>
<b>Analista 1</b>	2,04	0,024	0,055	1,2
<b>Analista 2</b>	1,95	0,030	0,069	1,6

Para o padrão de maior concentração, verifica-se que todas amostras são aceites usando o critério estabelecido pela Luságua e que o valor de coeficiente de variação de repetibilidade é inferior a 10%.

Na Tabela 33 apresentam-se os resultados relativos ao Teste F para os valores da Tabela 32.

**Tabela 33** – Teste *F* para testar diferenças entre as análises ao padrão de 2 µg/L feitas por dois analistas.

	<i>Analista 2</i>	<i>Analista 1</i>
Variância	9,21E-04	5,21E-04
F	<b>1,76</b> < 3,18	

Através do Teste *F* verifica-se não ser possível provar a existência de diferenças significativas na precisão dos dois analistas, na análise do padrão de 2 µg/L. Os coeficientes de variação são ambos <10%.

O procedimento descrito para o estudo da repetibilidade dos padrões, foi igualmente realizado para os padrões de 0,8 µg/L e 1 µg/L. O Teste de Grubbs não identificou nenhum valor anómalo no conjunto de dados obtidos pelos diferentes analistas e os resultados relativos à repetibilidade estão apresentados nas Tabelas 34 e 36, assim como os resultados relativos ao Teste *F* (Tabelas 35 e 37). Este teste de repetibilidade foi feito duas vezes para cada analista, e obtiveram-se resultados semelhantes.

**Tabela 34** – Repetibilidade do padrão intermédio de concentração 0,8 µg/L de Hg para os dois analistas.

	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>CV%</i>
<b>Analista 1</b>	0,78	0,016	10	0,037	2,1
<b>Analista 2</b>	0,81	0,025	10	0,057	3,1

Para o padrão de 0,8 µg/L, verifica-se que todas as amostras são aceites pelo critério de aceitação anteriormente referido e que o valor do coeficiente de variação de repetibilidade é inferior a 10%. O teste de repetibilidade para este padrão foi efetuado duas vezes para cada analista entre Maio e Junho de 2014, com resultados semelhantes.

**Tabela 35** – Teste *F* para testar diferenças entre as análises do padrão intermédio de 0,8 µg/L feitas por dois analistas.

	<i>Analista 2</i>	<i>Analista 1</i>
Variância	6,46E-04	2,71E-04
F	<b>2,38</b> < 3,18	

À semelhança dos padrões anteriores, o resultado do Teste *F* permite constatar não ser possível provar que haja diferenças significativas na precisão dos dois analistas, na preparação do padrão de 0,8 µg/L.

**Tabela 36** – Repetibilidade do padrão de concentração 1 µg/L de Hg em CV-AAS para os dois analistas.

	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>CV%</i>
<i>Analista 1</i>	1	0,050	10	0,11	5,0
<i>Analista 2</i>	1	0,033	10	0,074	3,2

Verifica-se também que para o padrão de 1 µg/L todas as amostras são aceites pelo critério de aceitação referido e que o valor de coeficiente de variação de repetibilidade é inferior a 10%. O teste de repetibilidade para este padrão foi efetuado duas vezes para cada analista em Abril de 2014, com resultados semelhantes.

**Tabela 37** – Teste *F* para testar diferenças entre as análises ao padrão de 1 µg/L feitas por dois analistas.

	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Variância	2,53E-03	1,06E-03
F	<b>2,38</b> < 3,18	

O Teste *F* permite concluir que para o padrão de 1 µg/L também não é possível provar que haja diferenças significativas na precisão dos dois analistas.

Globalmente, verifica-se que o coeficiente de variação de repetibilidade é maior para o padrão de menor concentração. Considera-se que o método apresenta boa repetibilidade na medida em que a diferença entre duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade é inferior ao limite de repetibilidade em todos os resultados obtidos.

A precisão intermédia foi estimada para duas situações:

- a) Mesma matriz da amostra com concentrações diferentes;
- b) Mesma amostra mas em dias diferentes de análise.

Na Tabela 38 apresentam-se os valores de precisão intermédia em que o fator em variação é a concentração da amostra ou do padrão.

**Tabela 38** – Precisão intermédia variando a concentração da amostra ou do padrão no método de CV-AAS.

Amostra	Data (Ano de 2014)	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
Padrão 0,3 µg/L	Abril 1	0,30	0,31	0,01		3,28
	Abril 2	0,31				
Padrão 2 µg/L	Abril 2	2,03	2,04	0,02		0,98
	Abril 3	2,05				
Padrão 0,8 µg/L	Abril 4	0,80	0,81	0,01		1,24
	Abril 5	0,81				
Padrão 1 µg/L	Maio 1	1,00	1,01	0,01		1,00
	Maio 2	1,01				
C	Abril 6	0,95	0,94	0,03		3,21
	Abril 7	0,92				
D	Abril 8	0,59	0,58	0,03	0,02	5,22
	Abril 9	0,56				
Esteiro	Maio 3	0,73	0,73	0,00		0,00
	Maio 4	0,73				
Esteiro L	Maio 5	1,03	1,04	0,02		1,92
	Maio 6	1,05				
Bestida sul 2 L	Maio 7	0,93	0,95	0,03		3,17
	Maio 8	0,96				
Relacre 2012	Maio 9	0,39	0,38	0,03		8,00
	Maio 10	0,36				
Relacre 2013	Junho 1	0,33	0,32	0,03		9,52
	Junho 2	0,30				
Si				0,0187		

Foram analisadas algumas amostras e padrões com diferentes concentrações (mas com a mesma matriz) em toda a gama de trabalho. Os valores de *Si* (desvio padrão de precisão intermédia) foram calculados através da equação (Guia RELACRE nº13, 2000):

$$Si = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad \text{Equação 13}$$

Sendo:

$Y_{j1}$  – primeiro resultado obtido para a amostra j;

$Y_{j2}$  – segundo resultado obtido para a amostra j.

t – nº de amostras ensaiadas

A diferença relativa foi obtida pelo quociente entre a diferença absoluta dos duplicados e a média. No conjunto de amostras analisadas, os valores obtidos para a diferença relativa são inferiores a 10%, cumprindo o critério de aceitação do Laboratório Luságua.

Na Tabela 39 apresentam-se os resultados para o cálculo da precisão intermédia em que o fator de variação é o dia de análise para o padrão intermédio de 0,8 µg/L.

**Tabela 39** – Precisão intermédia para o padrão intermédio de 0,8 µg/L variando o dia da análise.

Data (Ano de 2014)	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
Março 1	0,82	0,83	0,02	0,02	2,41
	0,84				
Março 2	0,80	0,81	0,02		2,47
	0,82				
Abril 1	0,80	0,81	0,01		1,24
	0,81				
Abril 2	0,79	0,78	0,02		2,56
	0,77				
Maio 1	0,81	0,80	0,02		2,50
	0,79				
Maio 1	0,78	0,79	0,01		1,27
	0,79				
Si			0,0122		

Na Tabela 40 apresentam-se os resultados para o cálculo da precisão intermédia em que o fator de variação é o dia de análise para o padrão de 0,3 µg/L.

**Tabela 40** – Precisão intermédia para o padrão de 0,3 µg/L variando o dia da análise.

<b>Data (Ano de 2014)</b>	<b>Duplicados</b>	<b>Média</b>	<b>Diferença absoluta</b>	<b>Média das diferenças</b>	<b>Diferença relativa (%)</b>
Março 1	0,29 0,29	0,29	0		0
Março 2	0,30 0,31	0,31	0,01		3,28
Março 3	0,32 0,31	0,32	0,01	0,01	3,17
Abril 1	0,29 0,31	0,30	0,02		6,67
Abril 2	0,30 0,31	0,31	0,01		3,28
<b>Si</b>			<b>0,0084</b>		

Na Tabela 41 apresentam-se os resultados para o cálculo da precisão intermédia em que o fator de variação é o dia de análise para a amostra da Relacre 2013, cujo valor de concentração é 0,3 µg/L.

**Tabela 41** – Precisão intermédia para a RELACRE 2013 variando o dia da análise.

<b>Data (Ano de 2014)</b>	<b>Duplicados</b>	<b>Média</b>	<b>Diferença absoluta</b>	<b>Média das diferenças</b>	<b>Diferença relativa (%)</b>	<b>Erro relativo (%)</b>
Maio 1	0,42 0,40	0,41	0,02		4,88	37
Maio 2	0,33 0,30	0,32	0,03	0,03	9,52	7
Junho 1	0,31 0,34	0,33	0,03		9,23	10
<b>Si</b>			<b>0,0212</b>			

Verifica-se que a medição do dia 1 (Maio de 2014) apresenta um erro relativo elevado (37%), pelo que apenas se considerou para o cálculo da precisão intermédia, os resultados obtidos nos dias 2 e 3 (Maio e Junho de 2014).

Na Tabela 42 apresentam-se os resultados para o cálculo da precisão intermédia em que o fator de variação é o dia de análise para o padrão 2 µg/L.

**Tabela 42** – Precisão intermédia para o padrão de 2 µg/L variando o dia da análise.

Data (Ano de 2014)	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
Março	1,94	1,95	0,02		1,03
	1,96				
Abril	1,98	1,98	0		0
	1,98				
Abril	1,99	2,00	0,01	0,02	0,50
	2,00				
Maio	2,03	2,05	0,03		1,47
	2,06				
Junho	2,01	2,03	0,04		1,97
	2,05				
Si			0,0173		

O valor do desvio padrão de precisão intermédia (*Si*) é idêntico quando se fez variar a concentração das amostras ou dos padrões e o dia da análise. Constatou-se que o valor de *Si* é inferior para o padrão 0,3 µg/L. Quando se fez variar o dia da análise, verifica-se que o valor de *Si* aumenta com a concentração do padrão.

### 3.2.2. Avaliação direta

#### Cartas de controlo

As cartas de controlo devem ser consideradas como uma orientação para um laboratório e a sua elaboração depende das necessidades inerentes a cada laboratório. As cartas de controlo permitem detetar possíveis situações anormais que possam ocorrer durante a execução dos métodos de ensaio. Permitem visualizar a evolução e controlar continuamente os resultados obtidos nos métodos que são praticados internamente.

As cartas de controlo de indivíduos representam ao longo do tempo um determinado parâmetro ou uma média. As cartas de controlo de amplitudes representam ao longo do tempo a diferença de valores entre vários ensaios repetidos (dois ou mais) do mesmo material ou de materiais diferentes dentro de uma determinada gama de trabalho (Guia RELACRE nº9, 1998).

Neste trabalho são apresentadas cartas de controlo de indivíduos, em que se representa a variação ao longo do tempo dos seguintes parâmetros: declives, brancos,



duplicados e padrões de controlo. As cartas de controlo contêm um conjunto de linhas que permitem o controlo do processo (Guia RELACRE nº13, 2000):

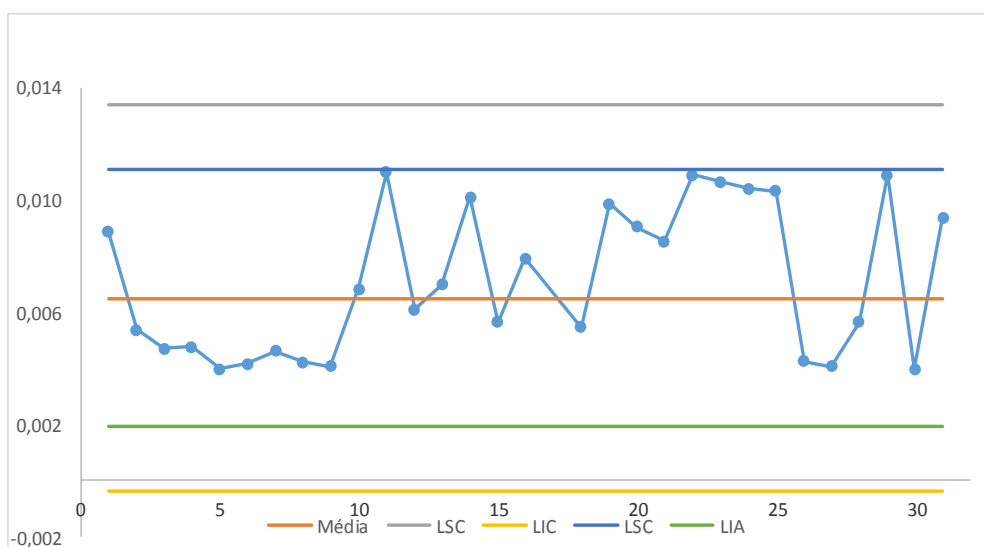
- Linha central: correspondente à média das leituras efetuadas;
- Limite superior de controlo (LSC): correspondente ao valor da linha central acrescida de três vezes o desvio padrão das leituras;
- Limite inferior de controlo (LIC): correspondente ao valor da linha central subtraída de três vezes o desvio padrão das leituras;
- Limite superior de aviso (LSA): definida a partir da linha central acrescida de duas vezes o desvio padrão das leituras.
- Limite inferior de aviso (LIA): definida a partir da linha central subtraída de duas vezes o desvio padrão das leituras.

Na carta de controlo de amplitudes de duplicados apenas existem duas linhas (Guia RELACRE nº13, 2000):

- Linha superior de controlo (LSC): definida pela média aritmética das amplitudes móveis (diferença, em módulo, entre o valor obtido da análise de um dia e o valor obtido na análise de outro dia), multiplicada por 3,267;
- Linha central: corresponde à média aritmética das amplitudes móveis.

Na carta de aceitação de brancos apenas existe uma linha construída segundo o critério do limite superior de aviso (LSA).

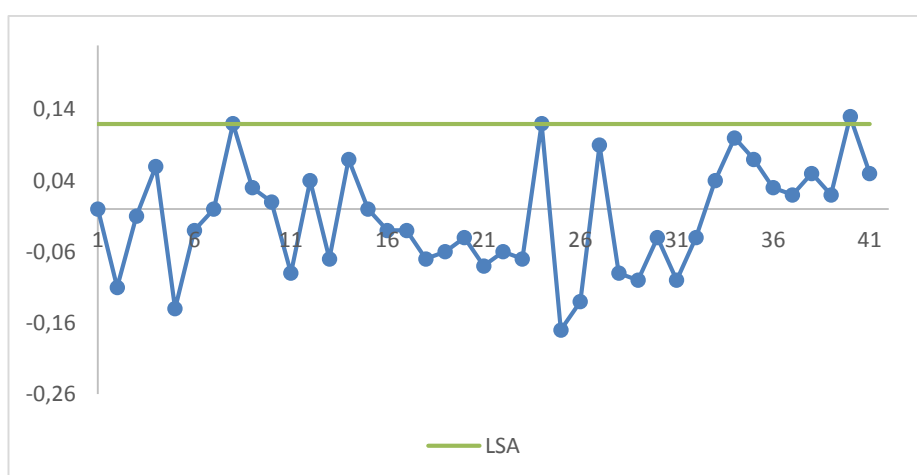
A análise dos declives das curvas de calibração pretende avaliar as flutuações nas calibrações devidas à resposta do equipamento ou a erros na preparação de padrões e/ou deterioração de reagentes. A carta para a aceitação de declives (Figura 10) foi construída a partir das primeiras 20 leituras, cujos valores a considerar são obtidos a partir da Equação 9.



**Figura 10** – Carta de aceitação de declives para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

A carta de controlo de declives permite verificar que não existe nenhuma tendência entre os resultados e que todos os valores estão dentro dos limites de controlo.

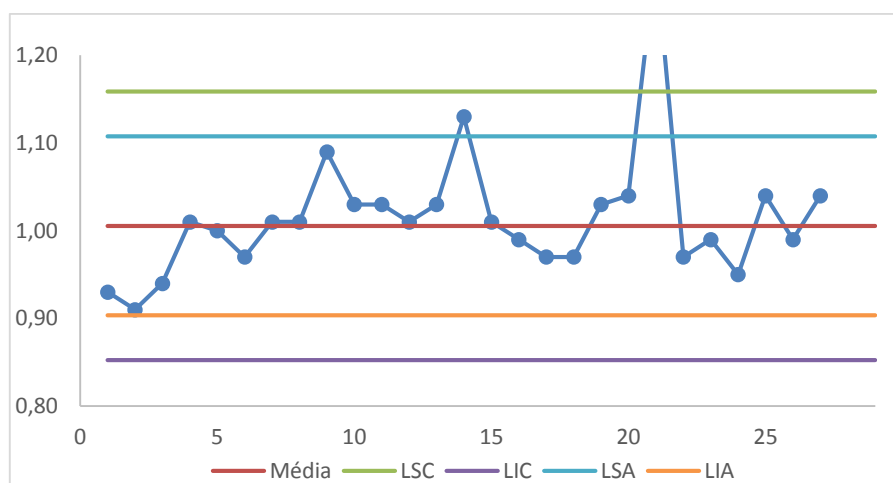
Na Figura 11 está representada a carta de aceitação para os brancos (definidos como sendo água destilada que é sujeita ao mesmo tratamento da amostra), construída a partir das primeiras 30 leituras. Esta carta é uma ferramenta que deteta eventuais contaminações ou alteração dos reagentes.



**Figura 11** – Carta de aceitação para brancos ( $\mu\text{g/L}$ ) para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

A análise da carta de controlo de brancos permite constatar que todos os valores estão dentro do limite de controlo e que não existe nenhuma tendência entre as leituras.

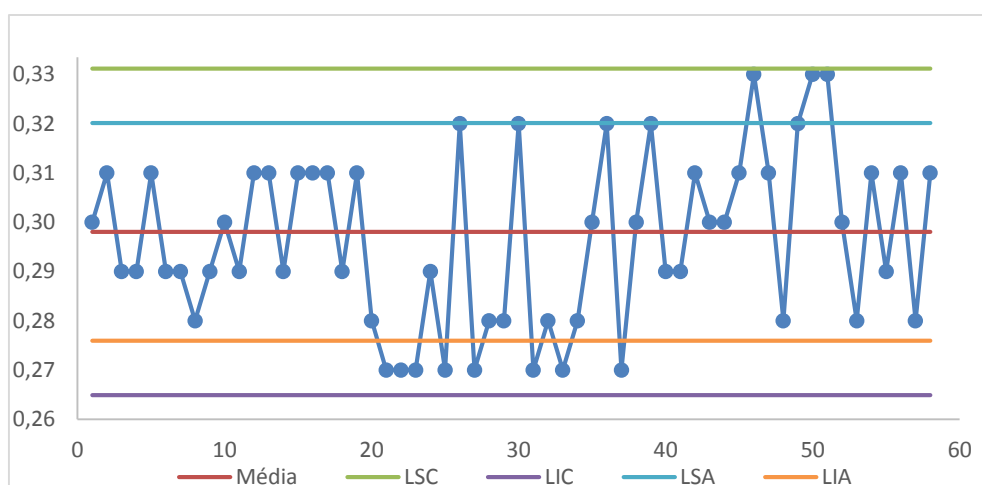
Na Figura 12 está representada a carta de controlo para o padrão de controlo 1 µg/L, construída a partir das primeiras 20 leituras.



**Figura 12** – Carta de indivíduos para o padrão de controlo 1 µg/L para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

A carta de controlo do padrão de controlo 1 µg/L mostra que apenas um valor ultrapassou a linha de controlo superior. Dado que todos os outros valores estão dentro dos limites de controlo e não apresentam nenhuma tendência, considera-se que não há fonte de erros sistemáticos e que aquele valor é resultado de uma situação anómala pontual.

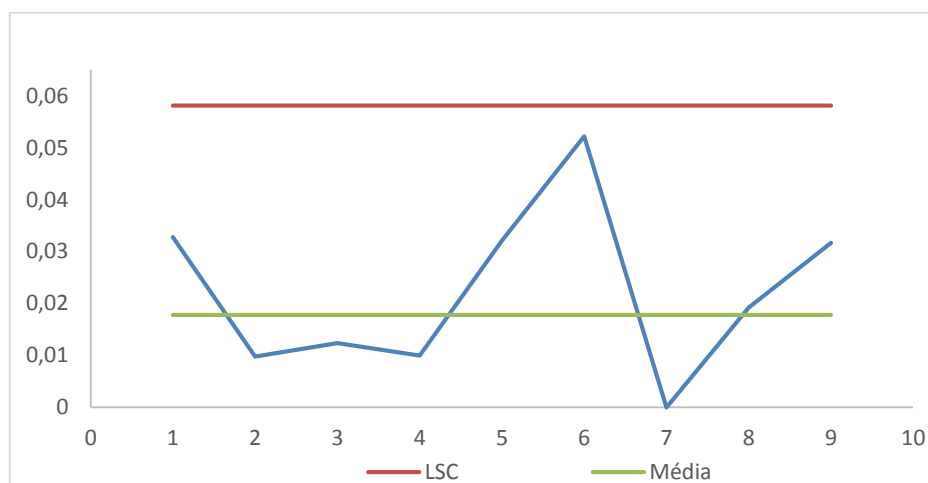
Na Figura 13 está representada a carta de indivíduos para o padrão de controlo 0,3 µg/L, construída a partir das primeiras 20 leituras.



**Figura 13** – Carta de indivíduos para o padrão de controlo 0,3 µg/L para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

A carta de controlo do padrão do 0,3 µg/L mostra que existe um considerável número de valores que igualam ou ultrapassam as linhas de aviso, no entanto como não se verifica nenhuma tendência entre os resultados e estando estes dentro dos limites de controlo, considerou-se que o método estava sob controlo.

Na Figura 14 está representada a carta de controlo de amplitudes de duplicados. O eixo das abcissas são as leituras efetuadas em dias diferentes (em duplicado).



**Figura 14** – Carta de controlo de amplitudes de duplicados para a análise de Hg por CV-AAS (Fevereiro a Junho de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

A Figura 14 permite verificar que não existe nenhuma tendência.

Os resultados obtidos no âmbito deste Estágio e que foram apresentados anteriormente, permitem dizer que foi possível validar o método de quantificação de Hg em águas de consumo usando o equipamento de CV-AAS existente no Laboratório Luságua para um limite de quantificação de 0,3 µg/L.

Na Tabela 43 é apresentada a nova ficha de validação do método de quantificação de mercúrio por CV-AAS, no laboratório da Luságua.

**Tabela 43** – Ficha de validação para o método de quantificação de Hg por CV-AAS a ser executado na Luságua.

<b>Ficha de validação para o método de quantificação de Hg no Laboratório Luságua</b>				
<b>Parâmetro</b>		<b>Valor obtido</b>	<b>Requisito</b>	<b>Observações</b>
Valor paramétrico (µg/L)		-	1	Diário da República, 1ª série - N°164 -27 de Agosto de 2007 ; Decreto - Lei nº306/2007
<i>Calibração</i>	Coefficiente de correlação	0,999	0,995	RELACRE
	Sensibilidade	7,10E-03	-	-
	Coefficiente de variação (%)	3,8	≤10	IUPAC
<i>Limites analíticos</i>	Limite de quantificação (µg/L)	0,3	0,3	Diário da República, 1ª série - N°164 -27 de Agosto de 2007 ; Decreto - Lei nº306/2007
	Coefficiente de variação (%)	4,7	≤10	IUPAC
	Erro relativo	0,03	≤0,2	Diário da República, 1ª série - N°164 -27 de Agosto de 2007 ; Decreto - Lei nº306/2007
<i>Repetibilidade</i>	Padrão concentração mais baixa	3,75E-02	≤0,1	Diário da República, 1ª série - N°164 -27 de Agosto de 2007 ; Decreto - Lei nº306/2007
	Padrão de concentração intermédia	4,70E-02		
	Padrão de controlo maior	9,40E-02		
	Padrão de concentração mais alta	6,18E-02		
<i>Precisão intermédia</i>	Variando a concentração da amostra	1,87E-02	≤0,1	Diário da República, 1ª série - N°164 -27 de Agosto de 2007 ; Decreto - Lei nº306/2007
	Padrão de concentração intermédia variando o dia da análise	1,22E-02		
	Padrão de concentração mais baixa variando o dia da análise	8,40E-03		
	Padrão de concentração mais alta variando o dia da análise	1,73E-02		
	Relacre 2013 variando o dia da análise	2,12E-02		
Recuperação (%)		88 - 118	80 -120	Estipulado pela RELACRE e aceite pela Luságua
Exatidão relativa aos ensaios de recuperação		0,01 - 0,15	≤0,2	Diário da República, 1ª série - N°164 -27 de Agosto de 2007 ; Decreto - Lei nº306/2007
Gama de trabalho (µg/L)		0,3 - 2	-	-

### 3.3. Validação do método de quantificação de mercúrio por fluorescência atômica no Laboratório da UA

#### 3.3.1. Avaliação indireta

##### Gama de trabalho

Para avaliar se a gama de trabalho é adequada, efetuaram-se dez leituras do primeiro e do último padrão em dias consecutivos. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 44, para os resultados obtidos no dia 1.

**Tabela 44** – Medições do padrão de 0,1 µg/L e 0,5 µg/L para o teste da homogeneidade de variâncias (Dia 1 – Abril de 2014).

<i>Padrões</i>	<i>0,1 µg/L</i>	<i>0,5 µg/L</i>
Sinal	13,4	58,1
	13,1	58,1
	12,6	58,1
	11,1	55,9
	10,7	55,9
	10,7	57,2
	10,4	56,6
	12,5	58,5
	11,9	58,9
	12,0	58,9
Média	11,8	57,6
Variância	1,15	1,34
Observações	10	
Graus de liberdade	9	
PG	<b>1,17</b> < 3,18	

Como se pode verificar, para a gama de trabalho escolhida, o valor de PG (Equação 14), é inferior ao valor de  $F$  crítico. O mesmo se verificou para o teste estatístico  $F$  efetuado no dia 2 – Maio de 2014 (**2,30** < 3,18).

$$PG = \frac{s_{0,5}^2}{s_{0,1}^2}$$

Equação 14

Considera-se  $S_{0,5}^2$  a variância associada ao padrão de 0,5 µg/L e  $S_{0,1}^2$  a variância associada ao padrão de 0,1 µg/L.

Este teste indica que a diferença entre as variâncias não é significativa e pode-se concluir que a gama de trabalho está ajustada.

### Reta de calibração

Para a técnica de fluorescência atômica de vapor frio o procedimento de validação foi idêntico ao utilizado na técnica de absorção atômica. Ao longo do trabalho foram efetuadas diversas curvas de calibração, cujos resultados vão sendo comentados ao longo deste trabalho. Tomando como exemplo alguns dos dados obtidos, é descrito de seguida o tratamento estatístico usado. A intensidade do sinal para cada padrão de calibração da gama escolhida, assim como a respetiva média, desvio padrão, intervalos de confiança e coeficientes de variação (obtidos pela Equação 4), apresentam-se na Tabela 45.

**Tabela 45** – Média das intensidades obtidas para os padrões de calibração de Hg em CV-AFS (Dezembro de 2013).

<b>Padrões (µg/L)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>
<b>Média do sinal</b>	15,9	31,4	47,7	62,7	78,1
<b>Desvio padrão</b>	0,25	1,3	2,2	4,1	0,87
<b>IC (95%)</b>	0,44	0,35	0,35	0,44	0,59
<b>CV (%)</b>	1,6	1,1	4,7	6,5	1,1

Como se pode verificar na Tabela 45 e na Tabela 50, onde são apresentados os resultados obtidos ao longo de vários dias de trabalho, os coeficientes de variação dos padrões nunca foram superiores a 10%.

Antes de traçar a curva de calibração, aplicou-se o Teste *t* para verificar se todos os pontos pertenciam à reta de calibração. Na Tabela 46 está apresentado o Teste *t* e respetiva decisão.

**Tabela 46** – Teste *t* (teste de hipóteses) para a decisão de pontos pertencentes à reta de calibração (Dezembro de 2013).

<b>Conc. (µg/L)</b>	<b>Y<sub>médio</sub></b>	<b>Y<sub>estimado</sub></b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Teste t</b>	<b>Decisão</b>
0	0,60	0,57	0,26	0,19	O ponto pertence à reta
0,1	15,97	16,11	0,25	-0,95	O ponto pertence à reta
0,2	31,45	31,64	1,28	-0,37	O ponto pertence à reta
0,3	47,68	47,18	2,22	0,56	O ponto pertence à reta
0,4	62,68	62,71	4,05	-0,02	O ponto pertence à reta
0,5	78,07	78,24	0,87	-0,49	O ponto pertence à reta

O Teste  $t$  permite verificar que todos os pontos pertencem à reta de calibração, pois os valores de  $t_{calculado}$  são inferiores ao valor de  $t_{tabelado}$ , para  $n-1$  leituras efetuadas para um intervalo de confiança de 95%. Ao longo do trabalho e para todas as curvas de calibração efetuadas, verificou-se que todos os pontos pertenciam à curva.

A linearidade da reta de calibração foi avaliada pela determinação do valor PG (Equação 6), e por comparação com o valor de  $F$  tabelado. A Tabela 47 apresenta os valores deste teste, onde se verifica que a função de calibração é linear para a análise de mercúrio por fluorescência atômica de vapor frio.

**Tabela 47** – Teste  $F$  para verificar a linearidade da reta de calibração.

PG=	-7,41E-02
F=	5,05
PG ≤ F	

A análise de variância, cujos resultados estão representados na Tabela 48, comprovou que o modelo mais adequado é o modelo linear.

**Tabela 48** – Coeficientes de correlação para os modelos linear e quadrático.

	Linear	Quadrática
Quadrado de R	0,99992	0,99993
Quadrado de R ajustado	0,99999	0,99988

O modelo linear apresenta o maior valor de  $R^2$  (Equação 7), indicando que 99.99% da variação total do sinal instrumental é atribuída às variáveis independentes, e que 0,01% dessa variância não pode ser explicada pelo modelo (Miller e Miller, 2010). Este facto foi observado em todas as retas de calibração obtidas. Assim sendo, traçou-se a reta de calibração e respetivos intervalos de confiança, considerando os dados da Tabela 45, descrita pela equação 15.

$$Y = 155,35 \pm 1,94 x + 0,572 \pm 0,587 \quad \text{Equação 15}$$

Tratando-se de uma curva de calibração definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da reta

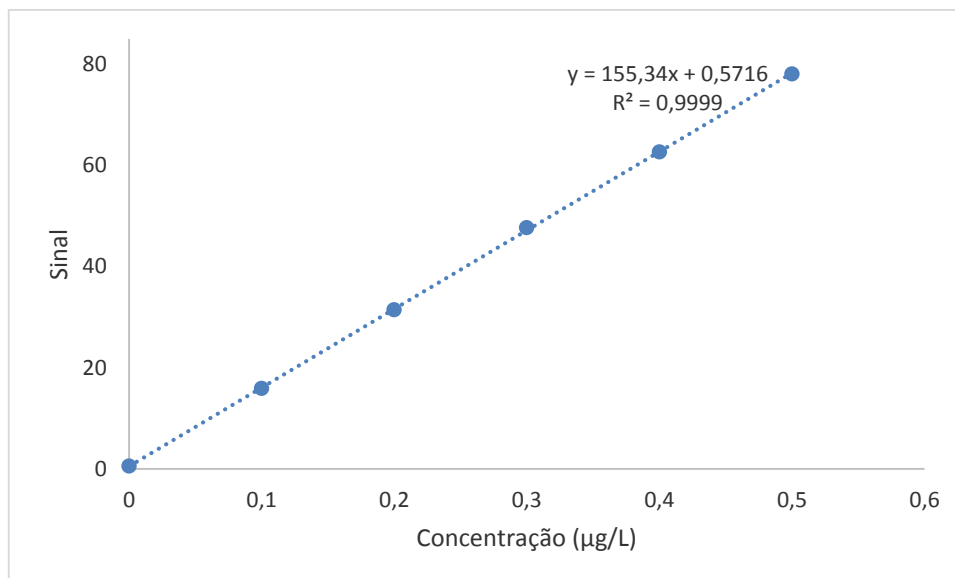


de calibração. O cálculo dos parâmetros para a análise de variância foi feito usando a ferramenta Excel, sendo os intervalos de confiança obtidos para  $t=2,78$  (95% GI=4). Os parâmetros da reta de calibração estão apresentados na Tabela 49. Os parâmetros das restantes retas obtidas ao longo do trabalho são apresentados na Tabela 50.

**Tabela 49** – Parâmetros da reta de calibração para quantificação de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013).

Parâmetro	Valor
Ordenada na origem (a)	$0,572 \pm 0,587$
$R^2$	0,9999 <b>&gt; 0,995</b>
Declive (b)	$155,35 \pm 1,94$
Sensibilidade	$155,35 \mu\text{g/L}$
$S_{y/x}$	0,29
$S_{r2}$	0,34
$S_b$ (desvio padrão do declive)	0,70
$S_a$ (desvio padrão da ordenada na origem)	0,21

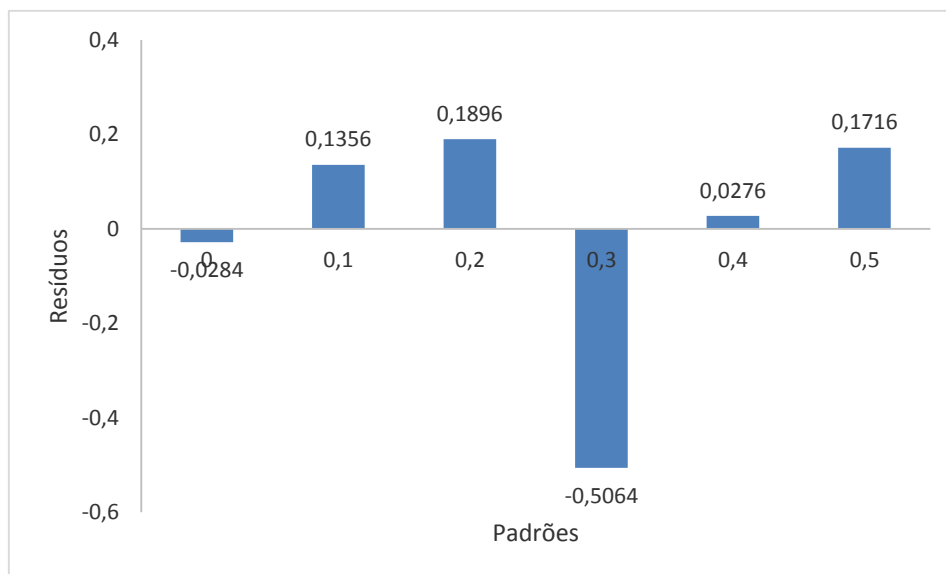
A curva de calibração obtida representa-se na Figura 15.



**Figura 15** – Curva de calibração para a análise de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013).

Como o valor do coeficiente de correlação é superior a 0,995, considera-se que a reta apresenta boa correlação do sinal de fluorescência em função da concentração dos padrões.

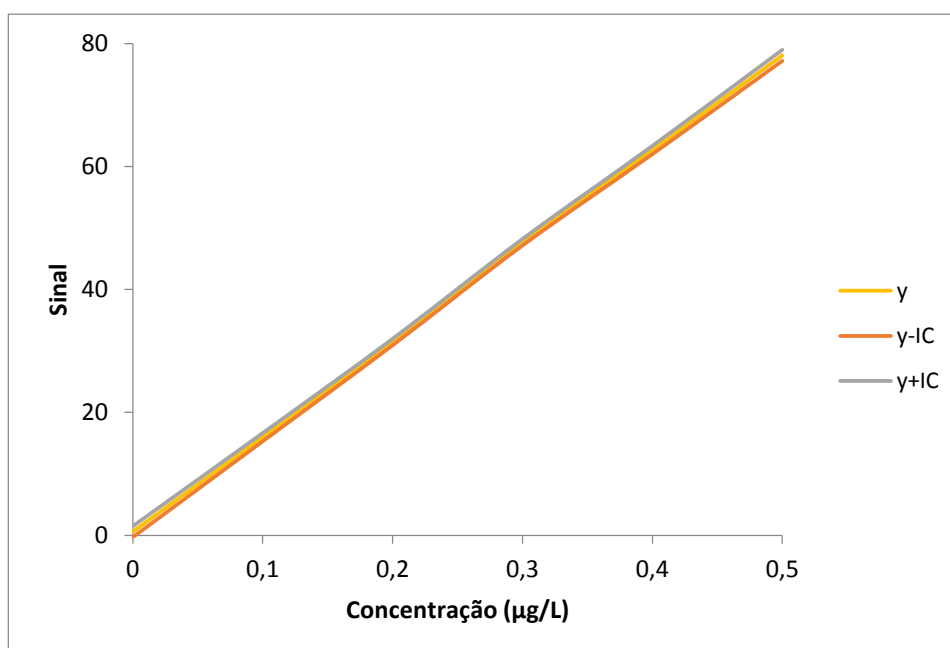
O valor dos resíduos para cada um dos padrões da curva de calibração é apresentado na Figura 16.



**Figura 16** – Valor dos resíduos para cada um dos padrões da reta de calibração para a quantificação de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013)

A Figura 16 permite verificar que não há um padrão de variação definido para os resíduos, ou seja, o erro não é sistematicamente superior ou inferior. O mesmo se verificou para as retas de calibração obtidas nos restantes dias.

A Figura 17 apresenta os intervalos de confiança associados à concentração dos padrões ao longo da curva de calibração.



**Figura 17** – Curvas associadas ao intervalo de confiança para os padrões de Hg em CV-AFS (Dezembro de 2013).

Verifica-se que os intervalos de confiança são pequenos, o que permite concluir que os resultados são confiáveis.

Na Tabela 50, estão resumidos os parâmetros das curvas de calibração efetuadas para este método.

**Tabela 50** – Parâmetros das curvas de calibração usadas para a determinação de Hg por CV-AFS.

<i>Data</i>	<i>Declives (b)</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>Ordenada na origem (a)</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>CV<sub>m</sub>(%)</i>
Dezembro de 2013 (1)	153,56	5,35	7,80E-02	1,62	0,9994	1,1
Dezembro de 2013 (2)	154,08	3,11	1,49E-01	0,94	0,9998	2,0
Dezembro de 2013 (3)	155,34	1,94	5,72E-01	0,59	0,9999	3,0
Novembro de 2013 (1)	154,22	8,07	-8,80E-01	2,44	0,9986	2,9
Dezembro de 2013 (4)	143,08	4,99	-7,63E-01	1,51	0,9994	3,1
Dezembro de 2013 (5)	144,40	6,51	3,03E-01	1,97	0,999	3,0
Dezembro de 2013 (6)	158,36	4,47	3,49E-01	1,35	0,9996	2,4
Abril de 2014 (1)	132,90	5,88	-1,52E-01	1,78	0,999	0,8
Abril de 2014 (2)	121,64	4,85	-4,30E-02	1,47	0,9992	0,8
Abril de 2014 (3)	138,56	3,83	1,52E-01	1,16	0,9996	1,3
Abril de 2014 (4)	126,00	4,04	-4,77E-01	1,22	0,9995	1,0
Maio de 2014 (1)	135,72	2,15	5,75E-01	0,65	0,9999	1,1
Maio de 2014 (2)	106,03	5,19	-6,57E-01	1,57	0,9988	1,0
Maio de 2014 (3)	103,29	3,32	2,47E-01	1,01	0,9995	1,4
Maio de 2014 (4)	102,46	3,57	2,52E-01	1,08	0,9994	2,0
Maio de 2014 (5)	90,84	2,95	-1,02E-01	0,90	0,9995	1,8
Maio de 2014 (6)	98,98	3,87	1,00E-03	1,17	0,9992	1,8
Maio de 2014 (7)	108,04	4,06	-2,87E-01	1,23	0,9993	1,5
Maio de 2014 (8)	114,91	2,81	1,82E+00	0,85	0,9997	2,9

- CV<sub>m</sub> – Coeficiente de variação médio; IC – Intervalo de confiança

Nos dados da Tabela 49, observa-se que os valores de  $R^2$  estão compreendidos entre 0,9986 e 0,9999, comprovando que todas as curvas têm boa correlação. Os coeficientes de variação médios (CV<sub>m</sub>%) nunca ultrapassam os 10%, tendo variado entre 0,8% e 3,1%.

### Limite de quantificação

Analogamente ao método de absorção atômica, o limite de quantificação do método de fluorescência atômica foi estabelecido como sendo o padrão de menor concentração, neste caso o padrão de 0,1 µg/L. Calcularam-se os coeficientes de variação (Equação 4),

erro relativo médio (Equação 10) e respetivos limites de repetibilidade ( $r$ ). O limite de quantificação é aceite se o método cumprir o critério de 10% para o coeficiente de variação e para o erro relativo. Se este critério não for cumprido deve-se testar um novo limite de quantificação.

Os resultados obtidos em dias diferentes (Maio de 2014), pelo mesmo analista apresentam-se na Tabela 51.

**Tabela 51** – Leituras do padrão de 0,1  $\mu\text{g/L}$  para validação do limite de quantificação para a quantificação de Hg por CV-AFS.

Padrão 0,1 $\mu\text{g/L}$	Média	Desvio padrão	n	r	Erro relativo médio (%)	CV %
Analista 1/Dia 1	0,09	7,30E-03	10	1,63E-02	10	8,1
Analista 1/Dia 2	0,1	8,80E-03	10	1,96E-02	0	8,8
Analista 1/Dia 3	0,09	2,90E-03	10	6,47E-03	10	3,2

O coeficiente de variação e o erro relativo foram calculados após teste aos valores anómalos usando o Teste de Grubbs. Após constatar que o método cumpre o critério de aceitação, tanto para o coeficiente de variação, como para o erro relativo, pode-se estabelecer o limite de quantificação de mercúrio por espectroscopia de fluorescência atómica de vapor frio na Universidade de Aveiro de 0,1  $\mu\text{g/L}$ .

### Ensaio de recuperação

Na Tabela 52 estão indicados os resultados obtidos nos ensaios de recuperação variando a concentração do *spike*. Os resultados da percentagem de recuperação foram obtidos pela Equação 11 e a exatidão, correspondente ao erro sistemático, foi obtida através do erro relativo (Equação 10).

**Tabela 52** – Ensaios de recuperação na análise de Hg por CV-AFS.

<i>Amostra</i>	<i>Data (Ano de 2014)</i>	<i>C<sub>amostra</sub> (µg/L)</i>	<i>C<sub>spike</sub> (µg/L)</i>	<i>C<sub>amostra+spike</sub> (µg/L)</i>	<i>Recuperação (%)</i>	<i>Exatidão (%)</i>
H	Abril	0,075	0,4	0,48	101	1
J	Abril	0,080	0,4	0,50	105	4
K	Maio	0,040	0,4	0,47	108	7
L	Maio	0,060	0,4	0,48	105	4
I	Maio	0,085	0,4	0,48	99	1
Poço 1	Maio	0,300	0,1	0,41	110	2
Poço 2	Maio	0,123	0,1	0,24	117	8
Poço 3	Maio	0,066	0,2	0,27	102	2
Esteiro	Maio	0,098	0,3	0,40	101	1
Bestida sul 1	Maio	0,372	0,2	0,49	59	14
Bestida sul 2	Maio	0,229	0,2	0,39	81	9
Bestida norte 1	Maio	0,197	0,2	0,41	107	3
Bestida norte 2	Maio	0,189	0,2	0,41	111	5
Esteiro L	Maio	0,214	0,2	0,45	118	9
Bestida sul 1 L	Maio	0,143	0,2	0,34	99	1
Bestida norte 1 L	Maio	0,124	0,2	0,35	113	8
Bestida norte 2 L	Maio	0,117	0,3	0,41	98	2

No conjunto dos ensaios de recuperação realizados, a percentagem de recuperação variou entre 81% e 118% e o erro sistemático entre 1% e 9%, mostrando que há boa exatidão e que o método cumpre os requisitos. Conclui-se que tanto o procedimento, quanto a matriz, não tiveram influência na deteção e quantificação do analito.

#### **Precisão (repetibilidade e precisão intermédia)**

Para avaliar a repetibilidade do método foram analisados 4 padrões e identificados os valores anómalos, através da aplicação do Teste de Grubbs (Equação 12). Os resultados deste teste são apresentados na Tabela 53 para o padrão intermédio de concentração 0,25 µg/L.

**Tabela 53** – Teste de Grubbs para o padrão intermédio de concentração 0,25 µg/L para a quantificação de Hg por CV-AFS, em Dezembro de 2013, em dias consecutivos.

<i>Leitura</i>	<i>Conc. (µg/L)</i>	<i>Conc. ordenadas (µg/L)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>G</i>
1	0,25	0,24			-1,59
2	0,25	0,24			
3	0,24	0,25			
4	0,25	0,25			
5	0,25	0,25	0,25	0,01	
6	0,26	0,25			
7	0,25	0,25			
8	0,24	0,25			
9	0,25	0,25			
10	0,25	0,26			1,94

O Teste de Grubbs permitiu verificar a inexistência de valores anómalos no conjunto de dez leituras do padrão de 0,25 µg/L, bem como para o conjunto de leituras dos restantes padrões (valores não apresentados).

Assim sendo, procedeu-se ao cálculo da repetibilidade e respetivo coeficiente variação, cujos valores são apresentados na Tabela 54.

**Tabela 54** – Repetibilidade do padrão intermédio de concentração 0,25 µg/L para a quantificação de Hg por CV-AFS (Dezembro de 2013).

<i>Conc.</i>	<i>Média</i>	<i>Desv pad</i>	<i><math>X_i - X_{i-1}</math></i>	<i>r</i>	<i>Crítério de aceitação</i>	<i>CV%</i>
0,25			0		Aceite	
0,25			-0,01		Aceite	
0,24			0,01		Aceite	
0,25			0		Aceite	
0,25	0,25	0,006	0,01	0,013	Aceite	2,23
0,26			0,01		Aceite	
0,25			-0,01		Aceite	
0,24			0,01		Aceite	
0,25			0		Aceite	
0,25						

Para o padrão intermédio de concentração 0,25 µg/L verifica-se que todas as amostras satisfazem o critério de aceitação e que o coeficiente de variação é inferior a 10%. Os resultados da repetibilidade para os outros padrões (0,1; 0,4 e 0,5 µg/L) encontram-se na Tabela 55.

**Tabela 55** – Repetibilidade para os padrões 0,1; 0,4 e 0,5 µg/L para a quantificação de Hg por CV-AFS.

<i>Concentração (µg/L)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>CV%</i>
0,1	0,096	0,005	10	0,012	5,4
0,4	0,388	0,014	10	0,032	3,6
0,5	0,485	0,016	10	0,036	3,3

Estes testes de repetibilidade foram feitos duas vezes para cada padrão entre Fevereiro e Março de 2014.

À semelhança da tendência observada no método da absorção atômica, o valor da repetibilidade (*r*) aumentou com o aumento da concentração do padrão.

A precisão do método foi avaliada também através da estimativa da precisão intermédia para duas situações:

- a) Mesma matriz da amostra com concentrações diferentes;
- b) A mesma amostra mas diferentes dias de análise.

Na Tabela 56 apresentam-se os valores de precisão intermédia em que o fator em variação é a concentração da amostra ou do padrão. Nesta primeira situação foram analisadas amostras e padrões com diferentes concentrações (mas com a mesma matriz) em toda a gama de trabalho.

**Tabela 56** – Precisão intermédia variando a concentração da amostra ou do padrão para a quantificação de Hg por CV-AFS.

Amostra	Data	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
Padrão 0,25 µg/L	Dezembro de 2013 (1)	0,25	0,25	0		0
	Dezembro de 2013 (2)	0,25				
Padrão 0,1 µg/L	Dezembro de 2013 (3)	0,10	0,10	0,01		10,53
	Dezembro de 2013 (4)	0,09				
Padrão 0,5 µg/L	Dezembro de 2013 (5)	0,49	0,49	0,01		2,06
	Dezembro de 2013 (6)	0,48				
Amostra M	Abril de 2014 (1)	0,11	0,10	0,02		20
	Abril de 2014 (2)	0,09				
Poço 1	Maio de 2014 (1)	1,47	1,49	0,03		2,02
	Maio de 2014 (2)	1,50				
Poço 2	Maio de 2014 (3)	0,63	0,62	0,02		3,23
	Maio de 2014 (4)	0,61				
Poço 3	Maio de 2014 (5)	0,33	0,33	0		0
	Maio de 2014 (6)	0,33				
Esteiro	Maio de 2014 (7)	0,55	0,49	0,12		24,49
	Maio de 2014 (8)	0,43				
Bestida sul 1	Maio de 2014 (9)	1,76	1,71	0,10		5,85
	Maio de 2014 (10)	1,66				
Bestida sul 2	Maio de 2014 (11)	1,11	1,15	0,07	0,04	6,11
	Maio de 2014 (12)	1,18				
Bestida norte 1	Maio de 2014 (13)	0,96	0,99	0,05		5,08
	Maio de 2014 (14)	1,01				
Bestida norte 2	Maio de 2014 (15)	0,93	0,96	0,06		6,25
	Maio de 2014 (16)	0,99				
Esteiro L	Maio de 2014 (17)	1,08	1,07	0,02		1,87
	Maio de 2014 (18)	1,06				
Bestida sul 1 L	Maio de 2014 (19)	0,72	0,72	0,01		1,40
	Maio de 2014 (20)	0,71				
Bestida sul 2 L	Maio de 2014 (21)	1,73	1,75	0,03		1,72
	Maio de 2014 (22)	1,76				
Bestida norte 1 L	Maio de 2014 (23)	0,63	0,62	0,02		3,23
	Maio de 2014 (24)	0,61				
Bestida norte 2 L	Maio de 2014 (25)	0,55	0,58	0,05		8,70
	Maio de 2014 (26)	0,60				
Relacre 2013	Maio de 2014 (27)	0,36	0,35	0,02		5,71
	Maio de 2014 (28)	0,34				
Si				0,0301		



No conjunto de amostras analisadas, verificou-se que duas amostras (M e Esteiro) apresentaram diferenças relativas elevadas, pelo que foram rejeitadas no cálculo da precisão intermédia.

Na Tabela 57 apresentam-se os resultados associados à precisão intermédia em que o fator de variação é o dia da análise para o padrão intermédio de 0,25 µg/L.

**Tabela 57** – Precisão intermédia para o padrão intermédio de 0,25 µg/L variando o dia da análise.

Data	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
Novembro de 2013	0,25 0,25	0,25	0		0,00
Novembro de 2013	0,25 0,25	0,25	0		0,00
Dezembro de 2013	0,25 0,26	0,26	0,01		3,92
Dezembro de 2013	0,25 0,24	0,25	0,01	0,005	4,08
Abril de 2014	0,25 0,24	0,25	0,01		4,08
Abril de 2014	0,24 0,24	0,24	0		0
Maio de 2014	0,24 0,24	0,24	0		0,00
Maio de 2014	0,25 0,24	0,25	0,01		4,08
<b>Si</b>			<b>0,0050</b>		

Na Tabela 58 apresentam-se os resultados para a precisão intermédia em que o fator de variação é o dia da análise para a amostra colhido no Poço 1.

**Tabela 58** – Precisão intermédia para a amostra colhida no poço 1 variando o dia da análise (Maio de 2014).

Dia	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
1	1,47 1,50	1,49	0,03	0,025	2,02
2	1,02 1,04	1,03	0,02		1,94
Si			0,0180		

Na Tabela 59 apresentam-se os resultados para a precisão intermédia em que o fator de variação é o dia da análise para a amostra colhida no Poço 2.

**Tabela 59** – Precisão intermédia para a amostra colhida no poço 2 variando o dia da análise (Maio de 2014).

Dia	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
1	0,63 0,61	0,62	0,02	0,02	3,23
2	0,74 0,72	0,73	0,02		2,74
Si			0,0141		

Na Tabela 60 apresentam-se os resultados para a precisão intermédia em que o fator de variação é o dia da análise para a amostra colhida no Esteiro de Estarreja.

**Tabela 60** – Precisão intermédia para a amostra colhida no Esteiro de Estarreja variando o dia da análise (Maio de 2014).

Dia	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
1	0,55 0,60	0,58	0,05	0,045	8,70
2	0,59 0,55	0,57	0,04		7,02
Si			0.0320		

Na Tabela 61 apresentam-se os resultados para a precisão intermédia em que o fator de variação é o dia da análise para a amostra colhida na Bestida sul 1.

**Tabela 61** – Precisão intermédia para a amostra Bestida sul 1 variando o dia da análise (Maio de 2014).

Dia	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
1	1,76 1,66	1,71	0,10	0,105	5,85
2	1,86 1,75	1,81	0,11		6,09
Si			0.0743		

Na Tabela 62 apresentam-se os resultados para a precisão intermédia em que o fator de variação é o dia da análise para a amostra da RELACRE de 2013 cujo valor de referência é 0,3 µg/L.

**Tabela 62** – Precisão intermédia para a RELACRE 2013 variando o dia da análise (Maio de 2014).

Dia	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)	Erro relativo (%)
1	0,32 0,30	0,31	0,02	0,015	6,45	3
2	0,33 0,32	0,33	0,01		3,08	10
Si			0,0112			

Nas Tabelas 63 e 64 apresentam-se os resultados para a precisão intermédia em que o fator de variação é o dia da análise para os padrões 0,5 µg/L e 0,1 µg/L.

**Tabela 63** – Precisão intermédia para o padrão de 0,1 µg/L variando o dia da análise.

<b>Data</b>	<b>Duplicados</b>	<b>Média</b>	<b>Diferença absoluta</b>	<b>Média das diferenças</b>	<b>Diferença relativa (%)</b>
Dezembro de 2013	0,09 0,09	0,09	0	0,004	0
Abril de 2014	0,10 0,10	0,10	0		0
Abril de 2014	0,09 0,10	0,10	0,01		10,53
Maio de 2014	0,10 0,10	0,10	0		0
Maio de 2014	0,09 0,10	0,10	0,01		10,53
<b>Si</b>			<b>0,0045</b>		

**Tabela 64** – Precisão intermédia para o padrão de 0,5 µg/L variando o dia da análise.

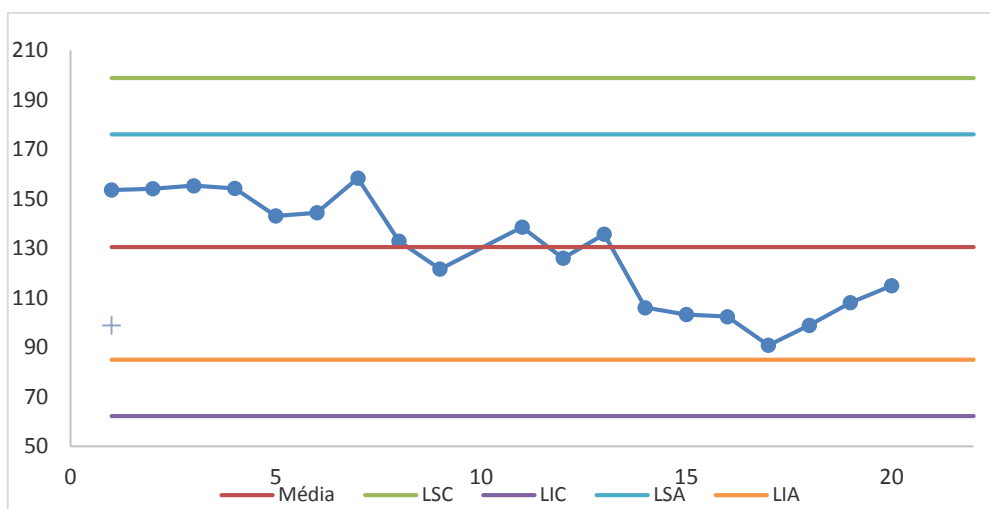
Data	Duplicados	Média	Diferença absoluta	Média das diferenças	Diferença relativa (%)
Dezembro de 2013	0,46 0,48	0,47	0,02		4,26
Abril de 2014	0,47 0,48	0,48	0,01	0,01	2,11
Abril de 2014	0,50 0,49	0,50	0,01		2,02
Maio de 2014	0,50 0,50	0,50	0		0
<b>Si</b>			<b>0,0087</b>		

A análise dos resultados da avaliação da precisão intermédia permite constatar que este parâmetro apresenta valores idênticos quando se fez variar a concentração da amostra e o dia da análise. No entanto, a precisão intermédia tem um valor superior quando a amostra tem concentração mais elevada. A precisão intermédia para os padrões de 0,1 µg/L, 0,25 µg/L e de 0,5 µg/L é inferior.

### 3.3.2. Avaliação direta

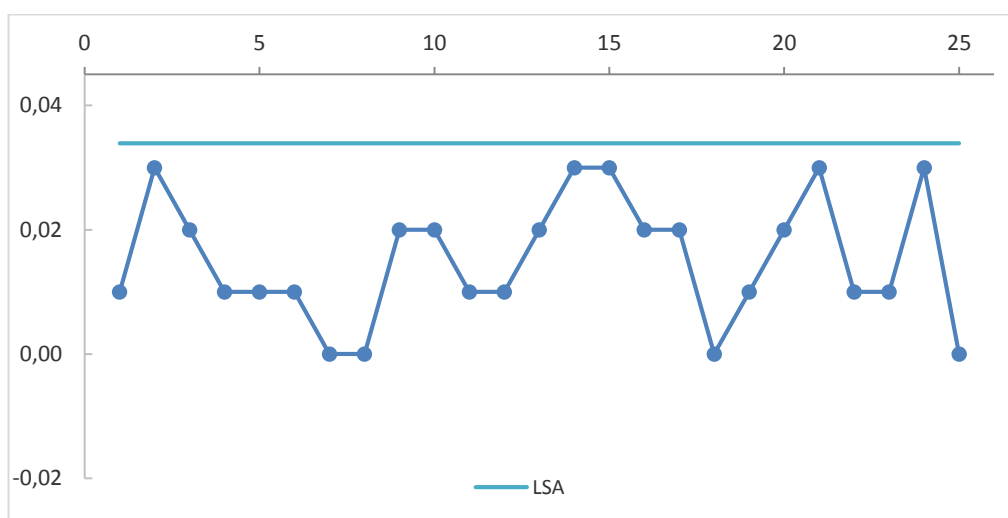
#### Cartas de controlo

Para avaliar as variações que possam ocorrer na calibração devido à resposta do equipamento, a erros na preparação dos padrões ou alteração dos reagentes, procedeu-se à elaboração de uma carta de declives. A carta para a aceitação de declives da Figura 18 foi construída a partir das primeiras 12 leituras e é possível verificar que todos os valores estão dentro dos limites de controlo e que não existe uma tendência nos resultados.



**Figura 18** – Carta de controle para a aceitação de declives para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

Na Figura 19 está representada a carta de controle para os brancos, correspondentes a água destilada tratada da mesma forma que as amostras, construída a partir das primeiras 20 leituras.

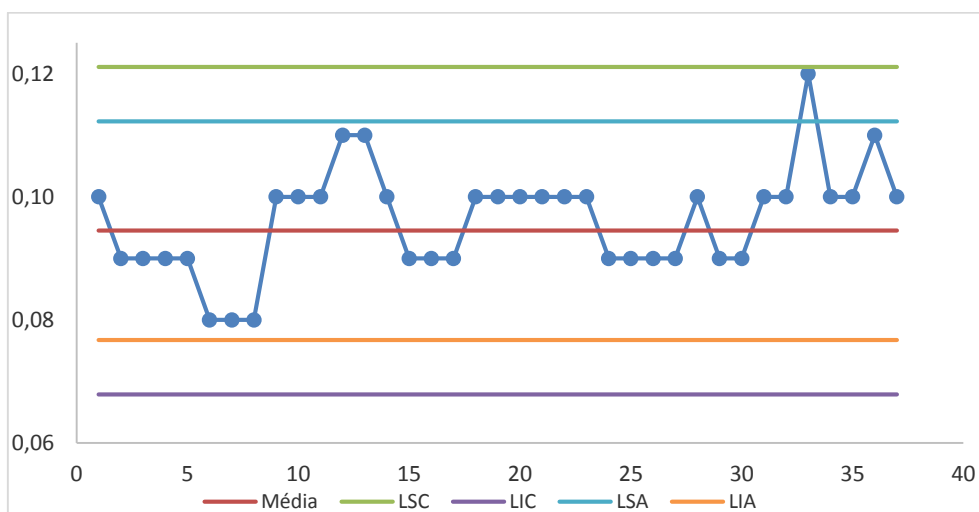


**Figura 19** – Carta de aceitação para brancos (µg/L) para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

A carta de aceitação para os brancos, evidência que os valores estão dentro do limite de controle e que não existe nenhuma tendência entre as leituras.

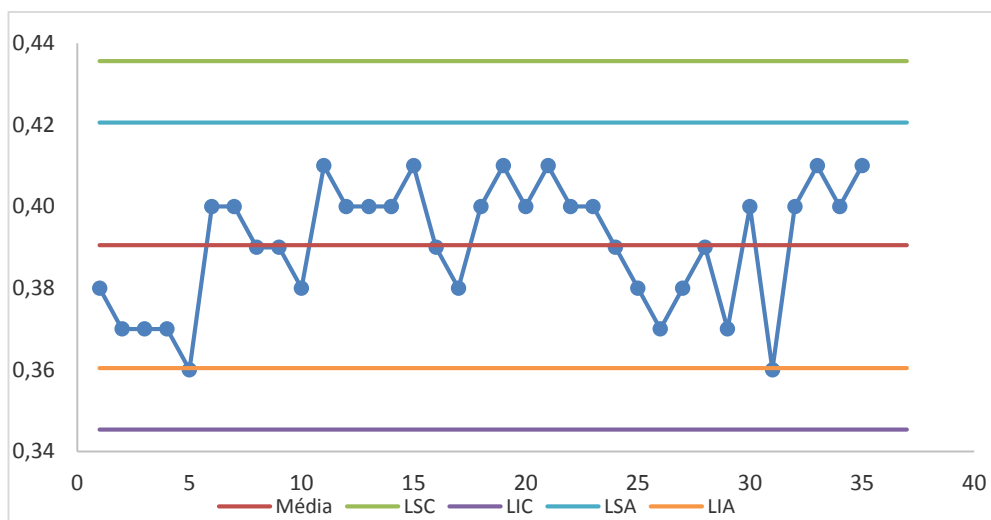
Na Figura 20 está representada a carta de controle para o padrão de controle de 0,1 µg/L, construída a partir das primeiras 20 leituras. A Figura 20 permite verificar que os valores estão dentro dos limites de controle e que não existe nenhuma tendência entre as

leituras. Assim, considera-se que não há fonte de erros sistemáticos na preparação e análise deste padrão.



**Figura 20** – Carta de indivíduos para o padrão de controlo de 0,1 µg/L para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

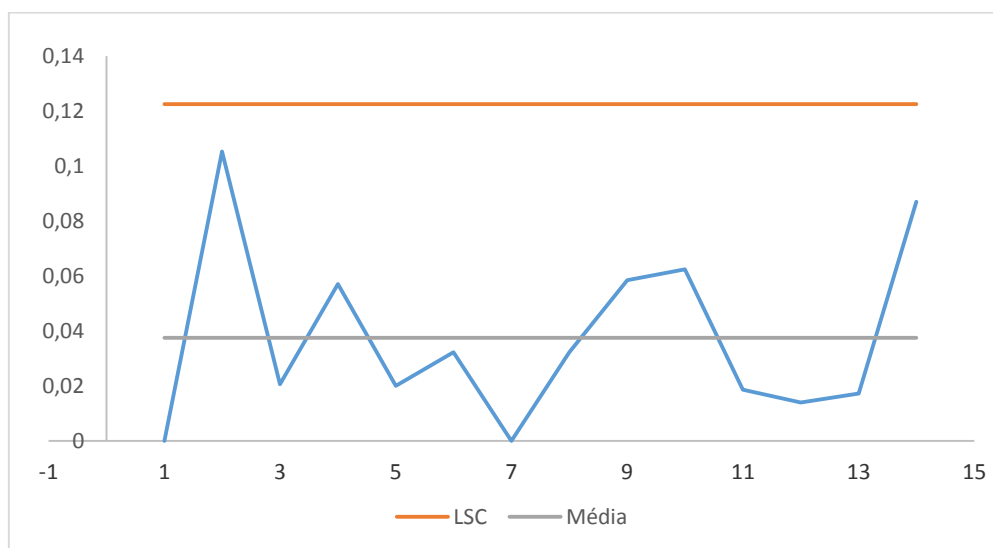
Na Figura 21 está representada a carta de indivíduos para o padrão de controlo de 0,4 µg/L, construída a partir das primeiras 20 leituras.



**Figura 21** – Carta de controlo para o padrão de controlo de 0,4 µg/L para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

Na carta de indivíduos para o padrão de controlo de 0,4 µg/L, observa-se que os valores estão dentro dos limites, não se verificando nenhuma tendência entre os resultados, considerando-se por isso que o método está sob controlo.

Na Figura 22 está representada a carta de controlo de amplitudes de duplicados. O eixo das abcissas são as leituras efetuadas em dias diferentes, e cada ponto representa uma amostra analisada em duplicado.



**Figura 22** – Carta de controlo de amplitudes de duplicados para a análise de Hg por CV-AFS (Novembro de 2013 a Maio de 2014; o eixo das abcissas corresponde ao número da leitura).

Na Figura 22 verifica-se a ausência de uma tendência para a amplitude de resultados e todos os pontos se encontram abaixo do limite superior de controlo.

### **3.4. Comparação do método de quantificação de mercúrio usado na Luságua e na UA**

A Tabela 65 resume os resultados de cada um dos parâmetros do processo de validação para ambos os métodos de análise de mercúrio.

**Tabela 65** – Resultados obtidos no processo de validação para os métodos de utilizados na análise de Hg na Luságua e na UA

		Hg (µg/L)	
		CV-AAS	CV-AFS
<b>Calibração</b>	Coeficiente de correlação <sub>m</sub>	0,9990	0,9994
	Coeficiente de variação <sub>m</sub> (%)	3,8	1,8
	Gama de trabalho	0,3 - 2	0,1 - 0,5
<b>Limiares analíticos</b>	Limite de quantificação (LQ)	0,30	0,10
	CV <sub>m</sub> (%)	4,7	6,7
	Erro relativo <sub>m</sub> (%)	3,2	6,7
<b>Repetibilidade</b>	Padrão concentração mais baixa	3,75E-02	1,20E-02
	Padrão concentração intermédia	4,70E-02	1,30E-02
	Padrão de controlo maior	9,40E-02	3,20E-02
	Padrão concentração mais alta	6,18E-02	3,60E-02
<b>Precisão intermédia</b>	Variando a concentração da amostra	1,87E-02	3,01E-02
	Padrão de concentração intermédia variando o dia da análise	1,22E-02	5,00E-03
	Padrão de concentração mais baixa variando o dia da análise	8,40E-03	4,50E-03
	Padrão de concentração mais alta variando o dia da análise	1,73E-02	8,70E-03
	Relacre 2013 variando o dia da análise	2,12E-02	1,12E-02
<b>Recuperação (%)</b>		88 - 124	81 - 118
<b>Exatidão relativa aos ensaios de recuperação (%)</b>		1-15	1-9
<b>Cartas de controlo</b>	Declives	Valores inferiores às linhas de controlo	Valores inferiores às linhas de controlo
	Branco	1 valor acima da linha superior de aviso	Valores inferiores às linhas de controlo
	Padrão de controlo menor	3 valores acima da linha superior de aviso; 8 valores abaixo da linha inferior de aviso	1 valor acima da linha superior de aviso
	Padrão de controlo maior	1 valor acima da linha superior de controlo; 1 valor acima da linha superior de aviso	Valores inferiores às linhas de controlo
	Amplitudes de duplicados	Valores inferiores às linhas de controlo	Valores inferiores às linhas de controlo

\* Os parâmetros com índice *m* indica que se trata do valor médio.



A análise global dos resultados permite identificar semelhanças e diferenças entre os dois métodos utilizados para a quantificação de mercúrio em águas de consumo (CV-AAS e CV-AFS).

Ambas as metodologias para a determinação de mercúrio apresentam valores de coeficiente de correlação superiores ao valor mínimo estipulado pela RELACRE, verificando-se uma boa correlação entre o valor da intensidade de sinal e o valor da concentração de mercúrio, independentemente da técnica utilizada.

O método com coeficiente de variação médio mais baixo foi o de CV-AFS.

O limite de quantificação é de 0,1 e 0,3 µg/L, respetivamente para a técnica de CV-AFS e de CV-AAS.

A diferença entre dois valores consecutivos (entre réplicas) nas duas técnicas foi sempre inferior ao limite de repetibilidade ( $r$ ), podendo-se afirmar que os valores obtidos apresentam boa concordância entre medições consecutivas e sob as mesmas condições.

Para a precisão intermédia, de um modo geral, os parâmetros em estudo para ambas as técnicas tem valores da mesma ordem de grandeza e ambos os métodos cumprem o critério estabelecido pela legislação.

A percentagem de recuperação e a exatidão são semelhantes nas duas técnicas.

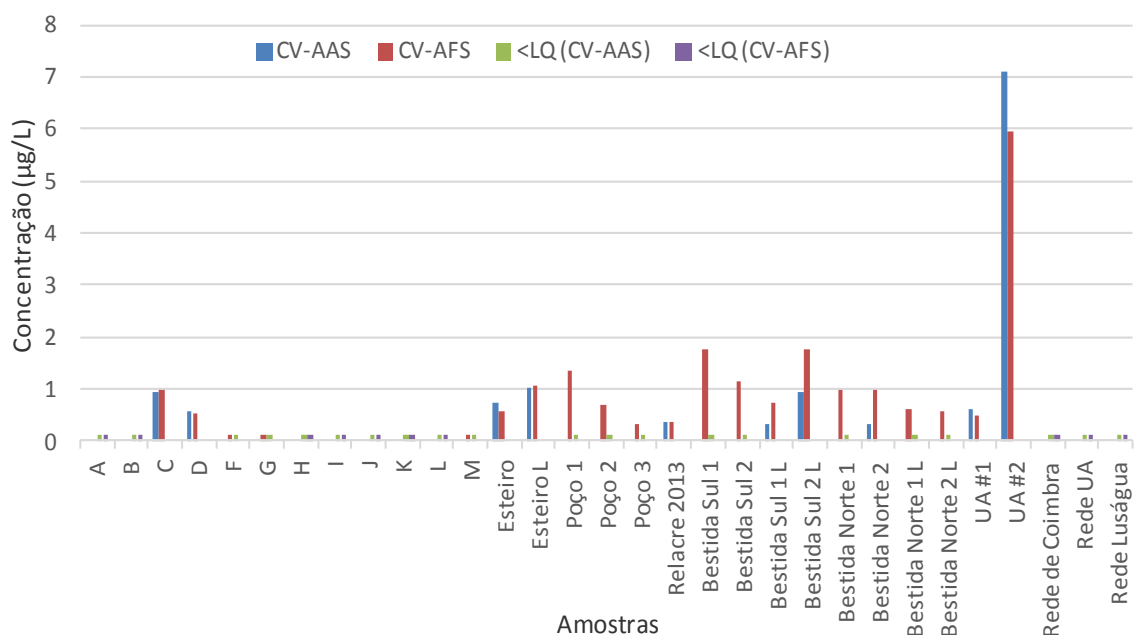
Nas cartas de controlo, de um modo geral, os dados obtidos pelas técnicas de CV-AFS e CV-AAS encontram-se todos dentro dos limites de controlo.

A comparação dos parâmetros de controlo de qualidade quantificados simultaneamente por CV-AFS (UA) e por CV-AAS (Luságua), não permitem identificar diferenças relevantes entre as duas técnicas, pelo que se considera que enquanto o equipamento do Laboratório Luságua continuar a ter a capacidade de análise demonstrada durante este Estágio, não se justifica o investimento num equipamento de CV-AFS.

Após o processo de validação dos métodos, procedeu-se à análise de amostras de água pelas duas técnicas. Os valores de concentração de mercúrio obtidos nas amostras de água analisadas estão na Tabela 66 e Figura 23.

**Tabela 66** – Concentrações de Hg obtidos por ambos os métodos nas amostras de água analisadas.

Amostras	Hg (µg/L)		Diferença entre os dois métodos (%)
	CV-AAS (LQ=0,3 µg/L)	CV-AFS (LQ=0,1 µg/L)	
A	<LQ	<LQ	-
B	<LQ	<LQ	-
C	0,94	0,99	5,3
D	0,58	0,51	12
F	<LQ	0,12	-
G	<LQ	0,11	-
H	<LQ	<LQ	-
I	<LQ	<LQ	-
J	<LQ	<LQ	-
K	<LQ	<LQ	-
L	<LQ	<LQ	-
M	<LQ	0,1	-
Esteiro	0,73	0,58	21
Esteiro L	1,03	1,07	3,9
Poço 1	<LQ	1,3	-
Poço 2	<LQ	0,68	-
Poço 3	<LQ	0,33	-
Relacre 2013	0,35	0,34	2,9
Bestida Sul 1	<LQ	1,8	-
Bestida Sul 2	<LQ	1,1	-
Bestida Sul 1 L	0,31	0,72	131
Bestida Sul 2 L	0,93	1,7	88
Bestida Norte 1	<LQ	0,99	-
Bestida Norte 2	0,3	0,96	220
Bestida Norte 1 L	<LQ	0,62	-
Bestida Norte 2 L	<LQ	0,58	-
UA #1	0,59	0,47	20
UA #2	7,1	6,0	16
Rede de Coimbra	<LQ	<LQ	-
Rede UA	<LQ	<LQ	-
Rede Luságua	<LQ	<LQ	-



**Figura 23** – Concentração de Hg (µg/L) em amostras analisadas por CV-AAS e CV-AFS.

As amostras designadas com as letras de A a M foram recebidas pelo Laboratório Luságua e eram provenientes de clientes. À exceção das amostras F, G e M que só foram quantificadas por fluorescência atômica, não se verificam diferenças relevantes nos resultados obtidos pelas duas técnicas para as amostras.

Para as amostras de água da rede de abastecimento recolhidas em Coimbra, na Universidade da Aveiro e na Luságua, os resultados obtidos estiveram abaixo do limite de quantificação das duas técnicas.

Os valores obtidos para a quantificação de mercúrio na amostra da RELACRE 2013 foram concordantes, quando analisada pelas duas técnicas. Sendo esta amostra uma referência, de concentração conhecida, é possível constatar que ambas as técnicas quantificam em conformidade.

As maiores diferenças entre os resultados fornecidos pelas duas técnicas foram registadas nas amostras de água recolhidas na Ria de Aveiro, na região da Bestida, nos lixiviados de sedimentos e nas amostras de águas recolhidas nos poços. Estas diferenças poderão ser explicadas pela matriz das amostras que poderá ter interferências que possam ter influência em ambas as técnicas. Como não foi feita uma caracterização exaustiva da composição destas amostras, não é possível justificar fundamentadamente estas diferenças.



# Conclusão

O mercúrio é um dos metais mais perigosos e tóxicos, mesmo em baixas concentrações e não deve por isso estar presente em águas de consumo humano. Segundo o Decreto-Lei nº306/2007, o mercúrio é um parâmetro de controlo de inspeção cujo valor paramétrico, em águas de consumo humano, é 1 µg/L Hg.

A análise de elementos que se encontram em baixas concentrações exige que sejam efetuados estudos que permitam avaliar a capacidade das técnicas analíticas instaladas nas empresas e instituições para os quantificar adequadamente.

Os laboratórios de análise de águas de consumo humano devem ter a capacidade de quantificar com exatidão e precisão os níveis de mercúrio nesta matriz tendo em consideração o valor paramétrico estipulado na legislação aplicada.

A importância deste trabalho reside na necessidade do Laboratório Luságua ter um método de análise válido e otimizado, capaz de responder adequadamente à lei em vigor para águas de consumo relativamente ao parâmetro mercúrio.

No final deste trabalho de Estágio o objetivo inicial proposto foi cumprido, na medida em que foi possível demonstrar que era possível baixar o limite de quantificação para a técnica de absorção atómica, tendo sido cumpridos todos os requisitos do processo de validação do método. Assim sendo, o limite de quantificação deste método passa a ser 0,3 µg/L, ou seja, três vezes 10% do valor paramétrico (1 µg/L).

As amostras analisadas no dia-a-dia do Laboratório Luságua durante o período do Estágio não excederam o valor paramétrico para o mercúrio em águas de consumo humano. Nas amostras de água superficial, cujo valor máximo estabelecido na Diretiva Quadro da Água é 0,07 µg/L, verifica-se que grande parte excede este valor, mas a diferença de valores obtidos pelas duas técnicas não permite tirar conclusões assertivas.

No âmbito deste Estágio foi ainda comparada a técnica de quantificação de mercúrio instalada no Laboratório Luságua com a existente no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. O equipamento de fluorescência atômica instalado na UA apenas quantifica mercúrio, enquanto o equipamento de absorção atômica utilizado pela Luságua permite acoplar, para além da técnica de vapor frio, a técnica de câmara de grafite e a técnica de chama. Assim sendo, é possível quantificar diversos metais no mesmo equipamento. Os parâmetros de controlo de qualidade que foram feitos para validar o método em ambos os locais, não permitiram identificar mais-valias relevantes em nenhum deles, pelo que não é relevante apontar para a necessidade de substituir o equipamento atualmente existente na Luságua, enquanto este mantiver a capacidade analítica atual.

Este Estágio foi uma mais-valia para mim como estudante, pois além de cumprir o objetivo que me foi proposto, tive oportunidade de adquirir experiência profissional em todas as áreas do Laboratório Luságua.

## REFERÊNCIAS

- ✓ Almeida, M.G. (2005). Contribuição para o estudo da avaliação de instalações de tratamento de águas. Desenvolvimento de um algoritmo de cálculo automático, Dissertação de Doutoramento da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 282.
- ✓ Atkins, P., de Paula, J. (2006). Physical Chemistry. W. H. Freeman and Company: 8th ed., 12, 445-446.
- ✓ Austin, P. A. (1994) Mercury and the ancient Maya. Trent University, Trent, Canada – Tese de Mestrado.
- ✓ Bettmer, J., Bradter, M., Buscher, W., Erber, D. Rieping, D. and Cammann, K. (1995). GC-MIP-PED as na Element-Specific System for the determination of organomercury compounds, Applied Organometallic Chemistry, 9, 541-545.
- ✓ Bose-O'Reilly, S., McCarty, K. M., Steckling, N., & Lettmeier, B. (2010). Mercury Exposure and Children's Health. Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, 40(8), 186-215.
- ✓ Carpi, A. (1997). Mercury from combustion sources: A review of the chemical species emitted and their transport in the atmosphere. Water, Air, and Soil Pollution, 98(3-4), 241-254.
- ✓ Červený, V., Horváth, M., & Broekaert, J. A. C. (2013). Determination of mercury in water samples by electrochemical cold vapor generation coupled to microstrip microwave induced helium plasma optical emission spectrometry. Microchemical Journal, 107, 10-16.
- ✓ Chen, H., Chen, J. Chen, Jin, X., Wei, D. (2009). Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction, Journal Hazardous Materials, 172, 1282 – 1287.

- ✓ EPA. 2000. The history of drinking water treatment, United States Environmental Protection Agency, Office of water, February, EPA – 816 – F – 00 – 006.
  
- ✓ EPA. 2006. Revision of December 2000 regulatory finding on the emission of hazardous air pollutants from electric utility steam generating units, United States Environmental Protection Agency, Office of air quality planning and standards, May, 2006.
  
- ✓ Gao, C., & Huang, X.-J. (2013). Voltammetric determination of mercury(II). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 51, 1-12.
  
- ✓ Guia RELACRE nº13, 2000. Validação de métodos internos de ensaio em análise química, RELACRE.
  
- ✓ Guia RELACRE nº3, 1996. Validação de resultados em laboratórios químicos, RELACRE.
  
- ✓ Guia RELACRE nº7, 1996. Ensaio Interlaboratoriais em Química, RELACRE.
  
- ✓ Guia RELACRE nº9, 1998. Alguns exemplos de catas de controlo em Laboratórios de análise química, RELACRE.
  
- ✓ Gleick, P. H. (1993). *Water in crisis: a guide to the world's fresh water resources*. Oxford University Press: 1st ed., 2, 13-23.
  
- ✓ Goel, P. K. (2006). *Water Pollution: Causes, Effects and Control*. New Age International Publishers: 2nd ed.
  
- ✓ Goel, S.H., M. Reymond, E.J. Bouwer. (1995). Biodegradation of NOM: effect of NOM source and ozone dose, *J. Am. Water Works Assoc.*, 87 (1), 90-105.
  
- ✓ Hamre, H.J. (1993). *Amalgam og sykdom*. Oslo: Vidarforlaget, Norway, 216 p.
  
- ✓ Harris, D. C. (2008). *Análise Química Quantitativa*. LTC (Ed): 7th ed., Rio de Janeiro, 415 – 516.



- ✓ Hall, E.L., A.M. Dietrich. (2000). A brief history of drinking water. *Opflow*. 26(6), 46-49.
  
- ✓ Holmes, P., James, K., Levy, L. (2009). Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Science of the Total Environment*, 408(2), 171-182.
  
- ✓ IDEM. 2003. Public health considerations for drinking water supplies, Indiana Department of Environmental Management. Water quality report 2003, 6.
  
- ✓ IPCS (International Programme on Chemical Safety), (1991). Environmental Health Criteria 118 – Inorganic Mercury. United Nations Environment Programme, International Labour Organisation and World Health Organization (Eds.), World Health Organization, 13-147.
  
- ✓ Leopold, K., Foulkes, M., Worsfold, P. (2010). Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—a review. *Analytica Chimica Acta*, 663(2), 127-138.
  
- ✓ Liu, G., Cai, Y., O'Driscoll, N. (2011). Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury. John Wiley & Sons, Inc. (Eds), Hoboken, New Jersey, 1.
  
- ✓ Martín-Yerga, D., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2013). Electrochemical determination of mercury: A review. *Talanta*, 116(0), 1091-1104.
  
- ✓ Mendes, B., Oliveira, J. S. (2004). Qualidade da água para consumo humano: Lidel. A. Press Ed., Lisboa.
  
- ✓ Micaroni, R., Bueno, M., Jardim, W. d. F. (2000). Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Quim. Nova*, 23(4), 487-495.
  
- ✓ Miller, J.N., & Miller, J. C. (2010). Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Prentice Hall: 6th ed.
  
- ✓ Nunes, T., Casco, P., Pereira, M.E., Duarte, A.C., Figueira, E. (2007). Mercury flux evaluation to the atmosphere in a contaminated area (Esteiro de Estarreja). *Geophysical Research Abstracts*, 9, 10978.

- ✓ Pereira, M. (1996). Distribuição, Reactividade e Transporte do Mercúrio na Ria de Aveiro. Dissertação Doutorado, Universidade de Aveiro.
- ✓ Pereira, M.E, Lillebo, A.I., Pato, P., Válega, M., Coelho, J.P., Lopes, C.B., Rodrigues, S., Cachada, A., Otero, M., Pardal, M.A., Duarte, A.C. (2009). Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. *Environ Monit Assess*, 155, 39-49.
- ✓ Ramalhosa, E. (2002). Mercúrio na Ria de Aveiro: associações, reactividade e especiação. Dissertação Doutorado, Universidade de Aveiro.
- ✓ Reuther, R., Jaeger, L. and Allard, B. (1999), Determination of organometallic forms of mercury, tin and lead by in situ derivatization, trapping and gas chromatography-atomic emission detection, *Analytica Chimica Acta*, 394, 259-269.
- ✓ Sanchez-Rodas, D., Corns, W.T., Chen, B., Stockwell, P.B. (2010). Atomic Fluorescence Spectrometry: a suitable detection technique in speciation studies for arsenic, selenium, antimony and mercury. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(7), 933-946.
- ✓ Sychra, D.V., Svoboda, I.V., Rubeska, D.I. (1975). Atomic Fluorescence Spectroscopy. D. M. Cresser, Trans. V. N. R. Company Ed.
- ✓ Syversen, T., Kaur, P. (2012). The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(4), 215-226.
- ✓ Victorino, C.J.A. (2007). Planeta água morrendo de sede: uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos. – Porto Alegre: EDIPUCRS.
- ✓ Wang, Q., Kim, D., Dionysiou, D.D., Sorial, G.A., Timberlake, D. (2004). Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems — a literature review. *Environmental Pollution*, 131(2), 323-336.
- ✓ Welz, B., Sperling, M. (1999). Atomic Absorption Spectrometry. W-VCH (Ed.): 3rd ed.

- ✓ Weinheim (1991). Metals and Their Compounds in the Environment Occurrence, Analysis and Biological Relevance. Merian, E. and T.W. Clarkson (Eds).
- ✓ World Health Organization (2005) – Mercury in drinking water: Background document for development of WHO Guidelines for drinking water quality.
- ✓ Yin, C., Iqbal, J., Hu, H., Liu, B., Zhang, L., Zhu, B., & Du, Y. (2012). Sensitive determination of trace mercury by UV–visible diffuse reflectance spectroscopy after complexation and membrane filtration-enrichment. Journal of Hazardous Materials, 233–234, 207-212.
- ✓ Zhu, Z.L., Chan, G.C.Y., Ray, S.J., Zhang, X.R., Hieftje, G.M. (2008). Use of a solution cathode glow discharge for cold vapor generation of mercury with determination by ICP-atomic emission spectrometry, Analytical Chemistry, 80, 7043–7050.
- ✓ Zuane, J. (1997). Handbook of drinking water quality. Wiley: 2nd ed.

### **Referências consultadas em web sites**

[I] Quantidades de água na terra – Último acesso em Junho de 2014. Disponível em: <http://www.publico.pt/ciencia/noticia/descoberto-mineral-que-confirma-a-existencia-de-enormes-quantidades-de-agua-no-interior-da-terra-1628075>

[II] Lista de substâncias de risco prioritárias – Último acesso em Dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>

[III] Entidade reguladora dos serviços de águas e resíduos. Qualidade da água – Último acesso em Janeiro de 2014. Disponível em: <http://www.ersar.pt/website/ViewContent.aspx?SubFolderPath=%5CRoot%5CContents%5CSitio%5CConsumidores%5CServicos%5CQualidadeAgua&Section=consumidores&FolderPath=%5CRoot%5CContents%5CSitio%5CConsumidores%5CServicos&GenericContentId=0>

[IV] Decreto-Lei n.º 306/07. D.R. n.º 164 de 2007-08-27 – Último acesso em Dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.dre.pt/pdf1sdip/2007/08/16400/0574705765.pdf>

[V] Decreto-Lei n.º 236/98. D.R. n.º 176, Série I-A de 1998-08-01 – Último acesso em Dezembro de 2013. Disponível em: <http://dre.pt/pdf1s/1998/08/176A00/36763722.pdf>

[VI] World Health Organization: Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure, August 2008 – Último acesso em Dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf>

[VII] Measurement of mercury in water – method 245.1 – Último acesso em Dezembro de 2013. Disponível em: [http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007\\_07\\_10\\_methods\\_method\\_245\\_1.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007_07_10_methods_method_245_1.pdf)

[VIII] Measurement of mercury in water – method 245.7 – Último acesso em Dezembro de 2013. Disponível em: [http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007\\_07\\_10\\_methods\\_method\\_245\\_7.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007_07_10_methods_method_245_7.pdf)